



Identification et caractérisation de nouveaux inhibiteurs peptidiques de la protéase 2A du rhinovirus humain

Nisrine Falah

► To cite this version:

Nisrine Falah. Identification et caractérisation de nouveaux inhibiteurs peptidiques de la protéase 2A du rhinovirus humain. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10027 . tel-01172178

HAL Id: tel-01172178

<https://theses.hal.science/tel-01172178>

Submitted on 7 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Présentée par **Nisrine FALAH**

**Identification et caractérisation de nouveaux
inhibiteurs peptidiques de la protéase 2A du rhinovirus
humain**

Thèse dirigée par le Dr Jean-Claude CORTAY

Soutenue le 1er février 2013

Devant le jury composé de :

Pr Bruno LINA
Pr Laurent KAISER
Pr Johan NEYTS
Dr Bruno BLONDEL
Dr Nicolas LEVEQUE
Dr Jean-Claude CORTAY

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

*Je remercie tout d'abord mes rapporteurs le **Pr Laurent Kaiser** et le **Pr Johan Neyts** qui ont accepté de relire et corriger ce manuscrit ainsi que le **Pr Bruno Lina** qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui a accepté d'être président de mon jury de thèse. Je tiens également à remercier le **Dr Bruno Blondel** et le **Dr Nicolas Lévêque** d'avoir accepté d'assister à ma soutenance et d'évaluer mon travail.*

*Je tiens à exprimer ma plus sincère reconnaissance et mon profond respect à mon directeur de thèse, **Jean-Claude Cortay**. Tout a commencé (un peu par hasard) en janvier 2009. J'étais alors en master 2 et **tu** recherchais un stagiaire pour initier l'aspect « cellulaire » de ton projet de recherche. **Tu** m'as fait confiance, **tu** m'as laissée prendre en main le sujet et je t'en suis très reconnaissante. Au fil des années, nous avons formé un duo complémentaire et avons surmonté ensemble les nombreux obstacles qui se sont trouvés sur notre chemin... Nous avons également eu la chance de travailler dans un contexte international au fil de nos collaborations et de nos rencontres : de Monastir à Calcutta en passant par Istanbul et Dubaï (à quand Rio ?...), nous avons établi des liens solides avec de nombreux collaborateurs. Encore merci Jean-Claude pour **ta** patience, **ta** disponibilité, **ton** soutien, **ton** humour, **tes** nombreux conseils et **ton** amitié.*

*Je remercie **Sébastien Violot** pour son expertise sur la modélisation de la structure 3D de protéines, son enthousiasme constant, sa grande disponibilité et bien sûr les pauses « glaces » en été.*

*Je tiens également à remercier **Didier Décimo** et **Théophile Ohlmann** pour leur savoir-faire sur la machinerie de traduction protéique et leur aide précieuse. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir permis de manipuler dans vos locaux. Merci pour vos conseils, nos discussions très enrichissantes et votre sympathie.*

*Merci à **Bruno Blondel** et **Francis Delpeyroux** d'avoir pris en main les expérimentations liées au poliovirus. Je tiens à vous remercier de m'avoir donné l'occasion de présenter mon travail à votre équipe et de nous avoir aidés à initier un*

nouvel aspect de mon projet de thèse. Merci également de vous être « occupés » de moi à St-Raphaël.

*Je souhaite remercier **Isabelle Schuffenecker** et **Monique Ballandras** pour leur expertise sur la production et la manipulation des entérovirus.*

*Merci à **Béatrice Riteau**, **Marie-Laure Grunenwald** et **Fatma Berri** qui nous ont aidés à mettre en place le modèle souris des infections à rhinovirus au laboratoire. Merci pour votre collaboration précieuse et vos échanges enrichissants.*

*Je souhaite remercier **Paul Dény** et l'ensemble de ses collaborateurs, **Vannary**, **Mariama**, **Edinete**, **Dulce**, **Pryanka**, **Délia**, **Natali** pour leur soutien et nos discussions enrichissantes tant sur le plan professionnel que personnel.*

*Merci à toute l'équipe de **BioDocs-Lyon** avec laquelle j'ai passé des heures et des heures de réunion et qui m'a permis de mieux appréhender mon avenir professionnel.*

*Un grand merci à tous les stagiaires qui ont travaillé avec nous et qui ont chacun apporté leur pierre à la maturation de notre projet : le duo des **Naoual**, **Awa**, **Sourour**, **Chaddia**, **Khadija**, **Alexia**, **Virginie**, **Ilhame**, **Dimitri**, **Vincent**, **Nicolas**, **Richard**, **Wandrille**, **Romain**, et **Julien**. Merci pour votre soutien, les fous rires et les bons moments que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite à tous une très bonne continuation.*

Je remercie également tous ceux qui ont fait ou qui font toujours partie du laboratoire VirPath et qui m'ont accompagnée dans cette aventure :

- ***Marie**, merci pour toutes nos discussions passées autour d'un petit pot de harissa, nos balades à vélo, ta joie et ta bonne humeur...*
- ***Ghina**, merci pour ton humour et les bons petits plats libanais que tu as partagés avec nous. J'espère que j'arriverai un jour à préparer un aussi bon houmous que le tien...*
- ***Emilie**, merci pour ton soutien, tes conseils et ta joie de vivre. A quand le prochain Chicken korma ?...*
- ***Vivian**, à l'humour inégalé...Merci pour tous les fous rires que nous avons pu avoir. J'espère suivre encore très longtemps tes aventures !*

- **Jean-Christophe**, merci pour ton soutien, pour nos soirées « boîte de nuit » dans le P2 et pour nos petits moments de galère lorsqu'il fallait régler les derniers détails des événements organisés par BioDocs...

Je remercie de tout cœur **mes parents** qui me soutiennent et m'encouragent depuis le début et qui ont toujours été là pour moi. Merci à ma sœur **Sabrine** et mon frère **Tawhid** pour leurs encouragements et leur présence. Merci également à ma deuxième famille, la **famille Hamrouni**, qui m'a accueillie les bras ouverts lorsque je suis arrivée à Lyon et avec laquelle j'ai vécu des moments inoubliables. Merci à **ma grand-mère, mes tantes, mes oncles et l'ensemble de mes cousins et cousines** (et il y en a beaucoup) qui m'ont toujours apporté leur soutien. Un grand merci à tous mes amis :

- **Naoual Ad.**, la jeune stagiaire devenue chef de projet en recherche clinique avec laquelle j'ai eu des fous rires inoubliables et avec laquelle j'espère vivre encore de nouvelles aventures,
- **Naoual Am.**, ma fidèle confidente, qui a su me conseiller dans mes moments de remise en question,
- **Sourour**, tu es présente depuis mon master et tu as su garder le sourire malgré les moments difficiles. J'espère sincèrement que tu vivras des jours meilleurs,
- **Marie, Cynthia, Sassou et les autres**, dont le soutien et la présence m'ont beaucoup aidée tout au long de la thèse.

Sommaire

<i>Abréviations</i>	- 15 -
<i>Liste des tableaux et figures</i>	- 19 -
<i>Résumé</i>	- 23 -
<i>Summary</i>	- 25 -
<i>Introduction</i>	- 29 -
1. Le Rhinovirus Humain.....	- 29 -
1.1. Classification et taxonomie des Entérovirus	- 29 -
1.2. Structure et Organisation génomique du Rhinovirus	- 29 -
1.2.1. Structure de la capside virale.....	- 29 -
1.2.2. Génome viral.....	- 35 -
1.2.3. Classification des rhinovirus et identification de nouvelles espèces.....	- 37 -
1.2.3.1. Classification basée sur le séquençage.....	- 37 -
1.2.3.2. La position de la structure CRE dans le génome viral permet de classer les RVH..	- 39 -
1.2.3.3. Classification selon le type de récepteurs cellulaires.....	- 39 -
1.2.4. Evolution des rhinovirus.....	- 39 -
1.3. Cycle de multiplication virale	- 43 -
1.3.1. Récepteurs cellulaires.....	- 43 -
1.3.1.1. Le récepteur ICAM-1.....	- 43 -
1.3.1.2. Le récepteur LDL.....	- 45 -
1.3.2. Adsorption, pénétration, décapsidation.....	- 47 -
1.3.3. Traduction de l'ARN viral et maturation de la polyprotéine.....	- 53 -
1.3.4. Réplication du génome viral.....	- 55 -
1.3.5. Assemblage et libération des virions.....	- 59 -
1.4. Effets du Rhinovirus sur la cellule hôte	- 61 -
1.4.1. Effets cytopathogènes.....	- 61 -
1.4.2. Inhibition de la transcription cellulaire.....	- 61 -
1.4.3. Inhibition de la traduction coiffe-dépendante.....	- 63 -
1.4.4. Altération du transport nucléo-cytoplasmique.....	- 63 -
1.4.5. Altération des membranes cellulaires.....	- 63 -
1.4.6. Inhibition du transport protéique entre le RE et l'appareil de Golgi.....	- 65 -
1.4.7. Inhibition de la réponse antivirale.....	- 65 -
1.4.8. Perturbation de l'homéostasie calcique.....	- 67 -
1.4.9. RVH et mort cellulaire.....	- 67 -
1.5. Epidémiologie et pathologies associées aux rhinovirus	- 69 -
1.5.1. Epidémiologie et circulation.....	- 69 -
1.5.2. Physiopathologie et réponse immune.....	- 71 -
1.5.3. Pathologies associées aux RVH.....	- 77 -
1.5.3.1. Le Rhume.....	- 77 -
1.5.3.2. Rhinosinusites et Otites.....	- 77 -
1.5.3.3. Rhinovirus et infection des voies aériennes inférieures.....	- 77 -

1.5.4. Modèles d'étude	81 -
1.6. Stratégies antivirales contre le RVH	83 -
1.6.1. Enjeux et contraintes de la découverte d'un traitement	83 -
1.6.2. L'utilisation d'interférons pour lutter contre le RVH.....	85 -
1.6.3. Inhibiteurs de l'attachement, de l'entrée et du « déshabillage » du virus	87 -
1.6.3.1. Utilisation d'anticorps ciblant les récepteurs cellulaires ICAM-1 et LDLR	87 -
1.6.3.2. Utilisation de formes solubles de ICAM-1 et LDLR	89 -
1.6.3.3. Utilisation de molécules se fixant à la capside.....	89 -
1.6.4. Inhibiteurs des protéases virales 2A et 3C	93 -
1.6.4.1. Inhibiteurs peptidiques de la protéase 3C	95 -
1.6.4.2. Inhibiteurs non peptidiques de la protéase 3C.....	97 -
1.6.5. Inhibiteurs de la machinerie de réplication.....	97 -
1.6.6. Utilisation de siRNA	99 -
1.6.7. Des produits naturels pour lutter contre le RVH.....	99 -
1.6.7.1. Echinacea (E. angustifolia, E. purpurea, E. pallida).....	101 -
1.6.7.2. L'ail ou Allium sativum.....	101 -
1.6.7.3. Le ginseng d'Amérique du Nord (Panax quinquefolium)	103 -
1.6.7.4. Géranium du Cap (Pelargonium sidoides)	103 -
1.6.7.5. Les carrageenanes (ou carraghénanes)	105 -
1.6.7.6. Le zinc.....	105 -
2. La protéase 2A du rhinovirus humain	107 -
2.1. Structure de la protéase 2A.....	107 -
2.1.1. Description générale de la structure	107 -
2.1.2. La triade catalytique de la 2A ^{pro}	107 -
2.1.3. Diversité au sein des protéases 2A du RVH	109 -
2.1.4. Comparaison avec la protéase 3C du RVH.....	111 -
2.1.5. Comparaison avec les chymotrypsine-like protéases	111 -
2.2. Rôle de la 2A^{pro} au cours de l'infection virale	113 -
2.2.1. La 2A ^{pro} assure la première étape de maturation de la polyprotéine virale.....	113 -
2.2.2. Rôle de la protéase 2A dans la réplication du génome viral	113 -
2.2.3. Clivage du facteur eIF4G et shut-off cellulaire.....	115 -
2.2.4. Clivage des protéines du pore nucléaire et perturbation du trafic entre le noyau et le cytoplasme.....	117 -
2.2.5. Protéase 2A et désorganisation du cytosquelette	119 -
2.2.6. Protéase 2A et épissage alternatif.....	121 -
2.2.7. Clivage de la protéine IPS-1 et inhibition de la réponse antivirale	121 -
2.2.8. 2A ^{pro} et apoptose.....	123 -
2.2.9. La 2A ^{pro} est-elle essentielle à la réplication du RVH ?	123 -
2.3. Spécificités de clivage de la protéase 2A	125 -
2.3.1. Stratégies mises en place pour définir les spécificités de clivage de la 2A ^{pro} et identifier de nouveaux substrats	125 -
2.3.2. Le résidu P1'	127 -
2.3.3. Le résidu P1 et le site S1	127 -
2.3.4. Le résidu P2 et le site S2	129 -
2.3.5. Le résidu P4 et le site S4	129 -
2.4. Inhibiteurs de la protéase 2A du RVH.....	131 -
2.4.1. Les inhibiteurs peptidiques de la 2A ^{pro}	131 -

2.4.1.1. Les inhibiteurs peptidiques dérivés des sites de clivage de la protéase 2A.....	- 131 -
2.4.1.2. Les inhibiteurs peptidiques dérivés d'inhibiteurs connus de protéases cellulaires.....	- 131 -
2.4.2. Les inhibiteurs non peptidiques de la 2A ^{pro}	- 135 -
3. Objectifs.....	- 135 -
Matériels et Méthodes.....	- 143 -
1. Identification de partenaires de la protéase 2A du RVH-2 par la technique du double-hybride chez la levure	- 143 -
2. Expression de protéines recombinantes dans un système bactérien et purification de protéines	- 143 -
3. Reconstitution d'un site de clivage complet de la 2A ^{pro} à partir des hexapeptides identifiés en double hybride.....	- 145 -
4. Expériences de type pull-down	- 147 -
5. Clivage du substrat TRPIITTA-pNA par la 2A ^{pro} du RVH-2.....	- 149 -
6. Culture cellulaire.....	- 151 -
7. Transfection transitoire de plasmides et extraction des protéines totales.....	- 151 -
8. Western blot	- 153 -
9. Transcription <i>in vitro</i> et transfection d'ARN	- 153 -
10. Virus, infection des cellules et titrage	- 155 -
11. Test de viabilité des cellules A549 en présence du peptide z.LVLQTM.fmk.....	- 157 -
12. Infection et traitement des souris balb/c.....	- 157 -
Résultats	- 163 -
Inhibition de la réplication du rhinovirus humain par un nouveau pseudo-substrat de la protéase virale 2A	- 163 -
Inhiber la réplication de l'enterovirus 71 humain en ciblant la protéase virale 2A.....	- 175 -
Conclusions et Perspectives	- 181 -
Références bibliographiques.....	- 195 -

Abréviations

2A ^{pro}	Protéase 2A
3C ^{pro}	Protéase 3C
ADNP	Activity Dependent Neuroprotective Protein
ARN	Acide RiboNucléique
CD54	Cluster of Differenciation 54
CMH-1	Complexe Majeur d’Histocompatibilité de classe 1
CNEA	Commission Nationale pour l’Expérimentation Animale
CNREEA	Comité National de Réflexion Ethique sur l’Expérimentation Animale
CRE	Cis-acting Replication Element
CV	CoxsackieVirus
DICT50	Dose Infectieuse CytoPathogène
ECP	Effets CytoPathogènes
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF	eukaryotic Initiation Factor
ESCOF	European Scientific Cooperative On Phytotherapy
EV	Entérovirus
FDA	Food and Durg Administration
FMDV	Foot and Mouth Disease Virus
GFP	Green Fluorescent Protein
HCV	Hepatitis C Virus
hnRNP	heterogenous nuclear RiboNucleoProtein
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IL	InterLeukine
IP3	Inositol 1,4,5-triPhosphate
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF	Interferon Regulatory Factor

LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LRP	LDLR-Related Protein
MPCMK	Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-ChloroMéthylKetone
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene-88
NC	Non Codant
NTR	Non TRaduite
Nup	Nucléopore
PABP	Poly-A Binding Protein
PBS	Predicted Biological Score
PCBP2	Poly(rC)-Binding Protein 2
PTB	Polypyrimidine Tract-Binding protein
PV	PolioVirus
RBM	RNA Binding Motif
RE	Réticulum Endoplasmique
RRM	RNA Recognition Motif
RVH	RhinoVirus Humain
siRNA	Small Interfering RNA
SMN	Survival of Motor Neurons
TLR	Toll Like Receptor
TRAF-6	TNF Receptor Associated Factor 6
TRIF	TIR-containing adaptator inducing interferon- β
Unr	Upstream of N-Ras
U snRNP	Uridine-rich Small Nuclear RiboNucleoProtein
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLDR	very-LDLR
VPg	Virion Protein genome linked
VRS	Virus Respiratoire Syncytial

Liste des tableaux et figures

Tableau 1. Classification et principales caractéristiques des picornavirus humains

Tableau 2. Manifestations cliniques associées aux entérovirus

Tableau 3. Résidus de ICAM-1 et du canyon des RVH-14 et RVH-16 impliqués dans la formation du complexe récepteur/virus

Tableau 4. Fonctions des protéines du rhinovirus humain

Tableau 5. Tableau récapitulatif des principales molécules chimiques antivirales testées contre le RVH et évaluées au cours d'essais cliniques

Tableau 6. Récapitulatif des inhibiteurs peptidiques de la 2A^{pro}

Figure 1. Classification des picornavirus

Figure 2. Structure de la capside du Rhinovirus humain

Figure 3. Organisation génomique des rhinovirus

Figure 4. Structure des régions 5' et 3' non codantes du génome des entérovirus

Figure 5. Position du motif CRE en fonction du groupe de RVH

Figure 6. Cycle de réplication des rhinovirus

Figure 7. Structure du récepteur ICAM-1 et représentation du complexe formé avec le RVH

Figure 8. Structure des récepteurs LDL et interaction avec les RVH du groupe mineur

Figure 9. Etapes précoces du cycle de réplication des RVH : adsorption, pénétration, décapsidation

Figure 10. Les différentes étapes de la maturation de la polyprotéine du RVH

Figure 11. Modèle de la réplication du poliovirus

Figure 12. Effets cytopathiques du rhinovirus sur les cellules MRC5

Figure 13. Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose

Figure 14. Schéma de l'induction de la réponse inflammatoire par le rhinovirus humain

Figure 15. Effets de l'intégrité de l'épithélium respiratoire sur la sévérité des infections à RVH et l'exacerbation d'asthme

Figure 16. Mode d'action des molécules inhibitrices du RVH se fixant à la capside

Figure 17. Evolution des composés WIN

Figure 18. Formule du Pirodavir et du BTA-798

Figure 19. Formule chimique de la ribavirine et de l'enviroxime

Figure 20. Structure de la protéase 2A du RVH-2

Figure 21. Arbre phylogénétique des protéases 2A des rhinovirus humains

Figure 22. La 2A^{pro} assure la première étape de maturation de la polyprotéine virale

Figure 23. Schéma explicatif de la nomenclature de Schechter et Berger

Figure 24. La 2A^{pro} clive le facteur eIF4G et participe au shut-off cellulaire

Figure 25. Inhibition du trafic nucléo-cytoplasmique par la protéase 2A

Figure 26. Représentation des sites de clivage connus des substrats naturels de la 2A^{pro} du rhinovirus

Figure 27. Alignement des séquences de la jonction VP1-2A des RVH des groupes A et B

Figure 28. Schéma récapitulatif des spécificités de clivage de la 2A^{pro} du RVH

Résumé

Parce qu'ils sont la première cause virale d'infections des voies respiratoires supérieures et inférieures, les rhinovirus humains (RVH) constituent un problème majeur de santé publique. À ce jour, aucun vaccin ni antiviral n'est disponible pour lutter contre ces agents pathogènes. Un crible en double-hybride chez la levure nous a permis d'identifier un nouveau partenaire peptidique de la protéase virale à cystéine 2A (2A^{pro}), l'hexapeptide LVLQTM. Ce dernier agit comme un véritable pseudosubstrat de la 2A^{pro} et inhibe son activité. Ce peptide a été modifié chimiquement à son extrémité C-terminale avec un groupement réactif électrophile fluorométhylcétone pour former une liaison covalente avec le groupement thiol nucléophile du site actif de l'enzyme viral. Des expériences réalisées *ex vivo* et *in vivo* ont montré que le peptide LVLQTM modifié était un puissant inhibiteur de la réplication du RVH dans les cellules A549 et chez la souris. La structure 3D déjà connue de la 2A^{pro} du RVH-2 a ensuite permis de modéliser la fixation de LVLQTM dans la poche de liaison du substrat de la protéase et la comparaison des séquences des 2A^{pro} des espèces RVH-A, -B et -C a révélé que les résidus impliqués dans l'interaction avec le peptide LVLQTM sont relativement bien conservés.

Si le peptide inhibiteur semblait donc agir contre tous les sérotypes de RVH, son utilisation à des fins thérapeutiques pouvait être étendue à d'autres entérovirus puisqu'il inhibait également la 2A^{pro} de l'entérovirus 71 (EV-71) et par conséquent la réplication virale. De plus, la comparaison de la séquence des protéases 2A de l'EV-71 avec celle du RVH-A2 n'a révélé aucune différence majeure. Par conséquent, cette étude ouvre de nouvelles perspectives dans la mise au point d'un antiviral à large spectre d'action contre tous les entérovirus.

Mots clés : rhinovirus, antiviral, entérovirus, protéase 2A, peptide inhibiteur

Summary

Human rhinoviruses (HRV) remain a significant public health problem as they are the major cause of both upper and lower respiratory tract infections. To date no vaccine or antiviral are available against these pathogens. Using a high-throughput yeast two-hybrid screening, we identified a six amino acid “hit” peptide, LVLQTM, which acted as a pseudo-substrate of the viral 2A cysteine protease (2A^{pro}) and inhibited its activity. This peptide was chemically modified at its C-terminus with a reactive electrophilic fluoromethylketone group to form a covalent linkage with the nucleophilic active site thiol of the enzyme. *Ex vivo* and *in vivo* experiments showed that thus converted, LVLQTM was a strong inhibitor of HRV replication in both A549 cells and mice. Based on HRV-2 2A^{pro} crystallographic data, a virtual docking model was then set up to predict the inhibitor binding mode into the ligand binding pocket of the enzyme. Sequence comparison between different 2A^{pro} from HRV-A, -B and -C species revealed that the aminoacid residues involved in the interaction with the inhibitor are relatively well conserved.

If our peptide inhibitor seemed to be of general use against all HRV serotypes, its use for therapeutic purposes could be extended to other enterovirus-associated diseases since it was also active against Human Enterovirus 71 (EV-71) 2A proteases and EV-71 replication. Moreover, comparison of the sequence of these proteases with the one of HRV-A2 revealed only minor differences in the residues involved in the interaction with LVLQTM. Therefore, this study opens new doors in the development of an antiviral against a wide range of enteroviruses.

Keywords : rhinovirus, antiviral, enterovirus, 2A protease, inhibitory peptide

Introduction

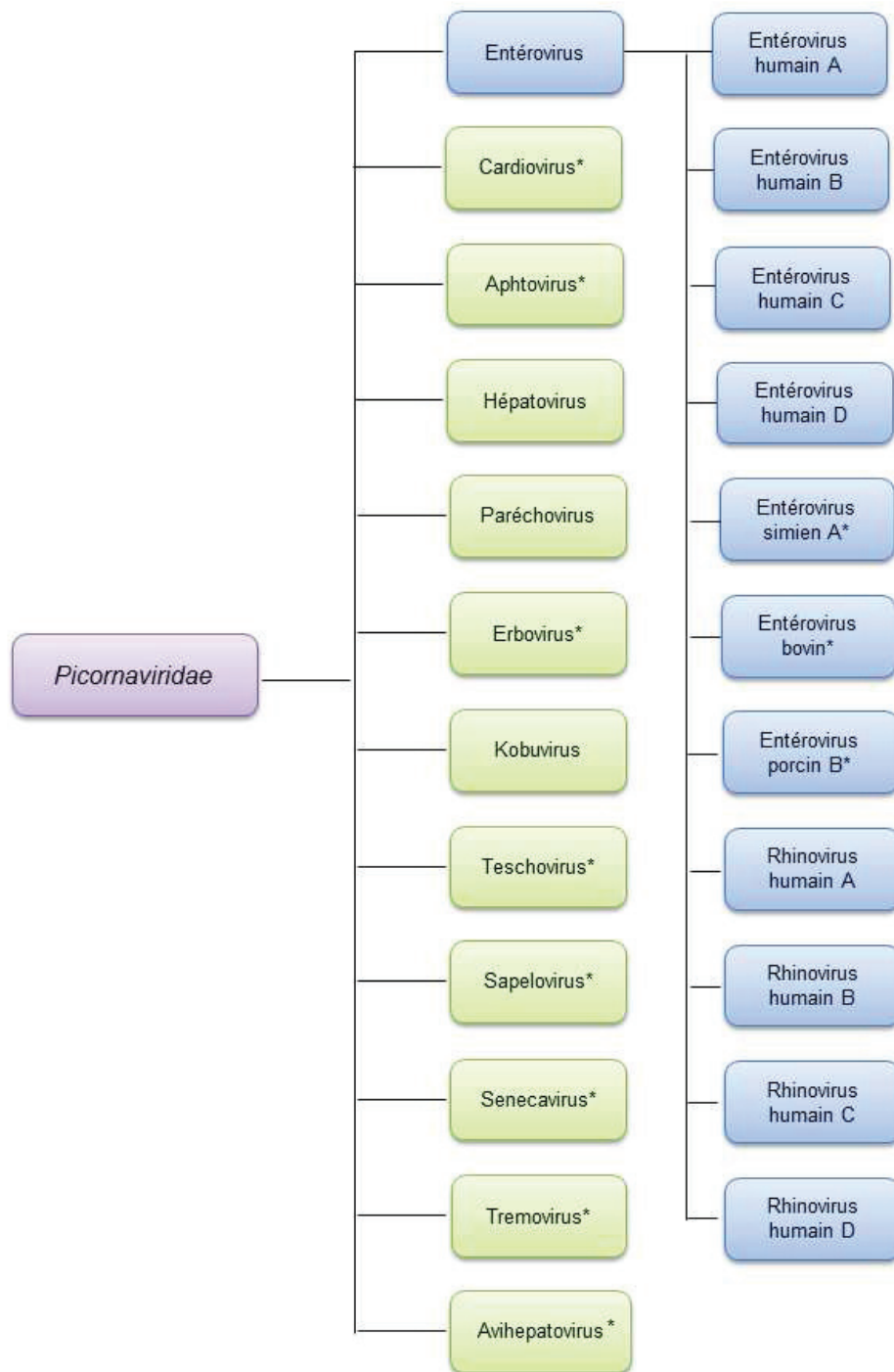


Figure 1. Classification des picornavirus.

Les genres et espèces animaux sont marqués par un astérisque.

Adapté de (Cordey 2008).

Introduction

1. Le Rhinovirus Humain

1.1. Classification et taxonomie des Entérovirus

Les rhinovirus humains (RVH) appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et plus particulièrement au genre entérovirus (EV). Les picornavirus (pico : petit et rna : acide ribonucléique) sont de petits virus non enveloppés de 30 nm de diamètre. Ils possèdent une capsidie icosaédrique qui renferme un ARN monocaténaire (environ 7200 nucléotides), non segmenté, de polarité positive. La famille des Picornavirus contient des virus humains et animaux classés actuellement en 12 genres (**Figure 1**) : Entérovirus, Cardiovirus, Aphtovirus, Hépatovirus, Paréchovirus, Erbovirus, Kobuvirus, Teschovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Tremovirus et Avihepatovirus (www.picornaviridae.com). Cinq nouveaux genres (Aquamavirus, Cosavirus, Dicipivirus, Megrivirus, Salivirus) ont été proposés en 2011 et leur intégration au sein de la famille des picornavirus a été étudiée et ratifiée par le comité international de la taxonomie des virus en juillet 2012 (Holtz, Finkbeiner et al. 2008; Kapoor, Victoria et al. 2008; Greninger, Runckel et al. 2009; Holtz, Finkbeiner et al. 2009; Li, Victoria et al. 2009). La classification des picornavirus est basée principalement sur la densité des virions en chlorure de césium, leur sensibilité aux pH acides, les signes cliniques et la séquence nucléotidique des génomes viraux (**Tableau 1**). Le genre Entérovirus est quant à lui divisé en 11 espèces (**Figure 1 et Tableau 2**) : entérovirus humain A-D, entérovirus simien A, entérovirus bovin, entérovirus porcine B et rhinovirus humain A-D. Deux nouvelles espèces (entérovirus F et entérovirus J) ainsi qu'une nouvelle nomenclature ont été soumises au comité internationale de la taxonomie des virus (**Tableau 2**).

1.2. Structure et Organisation génomique du Rhinovirus

1.2.1. Structure de la capsidie virale

Le rhinovirus humain possède une capsidie icosaédrique non enveloppée d'environ 30 nm de diamètre. La structure tridimensionnelle de la capsidie a été déterminée par

Genres	Espèces	Sérotypes	Densité en CsCl (g/cm ³)	Sensibilité au pH
Entérovirus	Entérovirus humain A	Coxsackievirus A (CVA) 2-8, 10, 12, 14, 16, enterovirus (EV) 71, 76, 89-91	1,34	stable pH 3 à 9
	Entérovirus humain B	CVA9, CVB1-6, échovirus 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, EV69, 73-75, 77-88, 97, 100, 101	1,34	stable pH 3 à 9
	Entérovirus humain C	CVA1, 11, 13, 17, 19-22, 24, EV96, poliovirus (PV) 1-3	1,34	stable pH 3 à 9
	Entérovirus humain D	EV68, 70	1,34	stable pH 3 à 9
	Rhinovirus humain A	Rhinovirus Humain (RVH) 1A, 1B, 2, 7, 9-13, 15, 16, 18-25, 28-34, 36, 38-41, 43, 44, 46, 47, 49-51, 53-68, 71, 73-78, 80-82, 85, 88-90, 94, 96, 98, 100-103	1,39-1,42	labile pH < 6
	Rhinovirus humain B	RVH 3-6, 14, 17, 26, 27, 35, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 83, 84, 86, 91-93, 97, 99, CU211	1,39-1,42	labile pH < 6
	Rhinovirus humain C	RVHC1-49	1,39-1,42	labile pH < 6
	Rhinovirus humain D	RVH8, 45, 95	1,39-1,42	labile pH < 6
Hépatovirus		Virus de l'hépatite A	1,34	stable pH 3 à 9
Paréchovirus		Paréchovirus humain 1-6	1,34	stable pH 3 à 9
Kobuvirus		Virus Aichi	1,34	stable pH 3 à 9

Tableau 1. Classification et principales caractéristiques des picornavirus humains.

D'après (Pallansch 2007; Rollinger and Schmidtke 2009) et www.picornaviridae.com

Espèces	Nouvelle nomenclature proposée	Syndrome clinique	Virus
Entérovirus humain A	Entérovirus A	herpangine syndrome pied-main-bouche méningite encéphalite paralysie flasque aigüe	CVA 2-6, 8, 10 CVA 5, 10, 16 ; EV 71 CVA-2, 4, 7, 9, 10 ; CVB 1-6; EV 71 EV 71 EV 89, 90, 91
Entérovirus humain B	Entérovirus B	exanthème pleurodynie péricardite, myocardite méningite encéphalite paralysie flasque aigüe	Echovirus 2, 4, 6, 9, 11, 30 CVB 1-5 CVB 1-5 Echovirus 2, 4, 6, 9, 14 ; CVB 1-6 Echovirus 2, 4, 6, 9, 19 ; CVB 1-6 EV 85, 86, 87, 88, 97, 100
Entérovirus humain C	Entérovirus C	sans pathologie associée diarrhée rhume syndrome grippal conjonctivite hémorragique méningite encéphalite paralysie flasque aigüe	CVA 1, 11, 13, 17, 19 CVA 18, 20-22, 24 CVA 21-24 EV 109 CVA 24 PV 1-3 PV 1-3 PV 1-3
Entérovirus humain D	Entérovirus D	bronchiolites conjonctivite hémorragique encéphalite méningite	EV 68 EV 70 EV 70 EV 70
Entérovirus bovin A	Entérovirus E	diarrhée	
Entérovirus bovin B	Entérovirus F	diarrhée	
Entérovirus porcin B	Entérovirus G	encéphalomyélite	EV porcin 9, 10, 14, 15
Entérovirus simien A	Entérovirus H		EV simien A1
Virus simiens non classés	Entérovirus J		
Rhinovirus humain A	Rhinovirus A	rhume	RVH 1A, 1B, 2, 7, 9-13, 15, 16, 18-25, 28-34, 36, 38-41, 43, 44, 46, 47, 49-51, 53-68, 71, 73-78, 80-82, 85, 88-90, 94, 96, 98, 100-103
Rhinovirus humain B	Rhinovirus B	rhume	RVH 3-6, 14, 17, 26, 27, 35, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 83, 84, 86, 91-93, 97, 99, CU211
Rhinovirus humain C	Rhinovirus C	infection des voies respiratoires inférieures	RVHC 1-49
Rhinovirus humain D	Rhinovirus D	rhume	RVH 8, 45, 95

Tableau 2 : Manifestations cliniques associées aux entérovirus.

PV: poliovirus ; CV: coxsackievirus ; EV: entérovirus

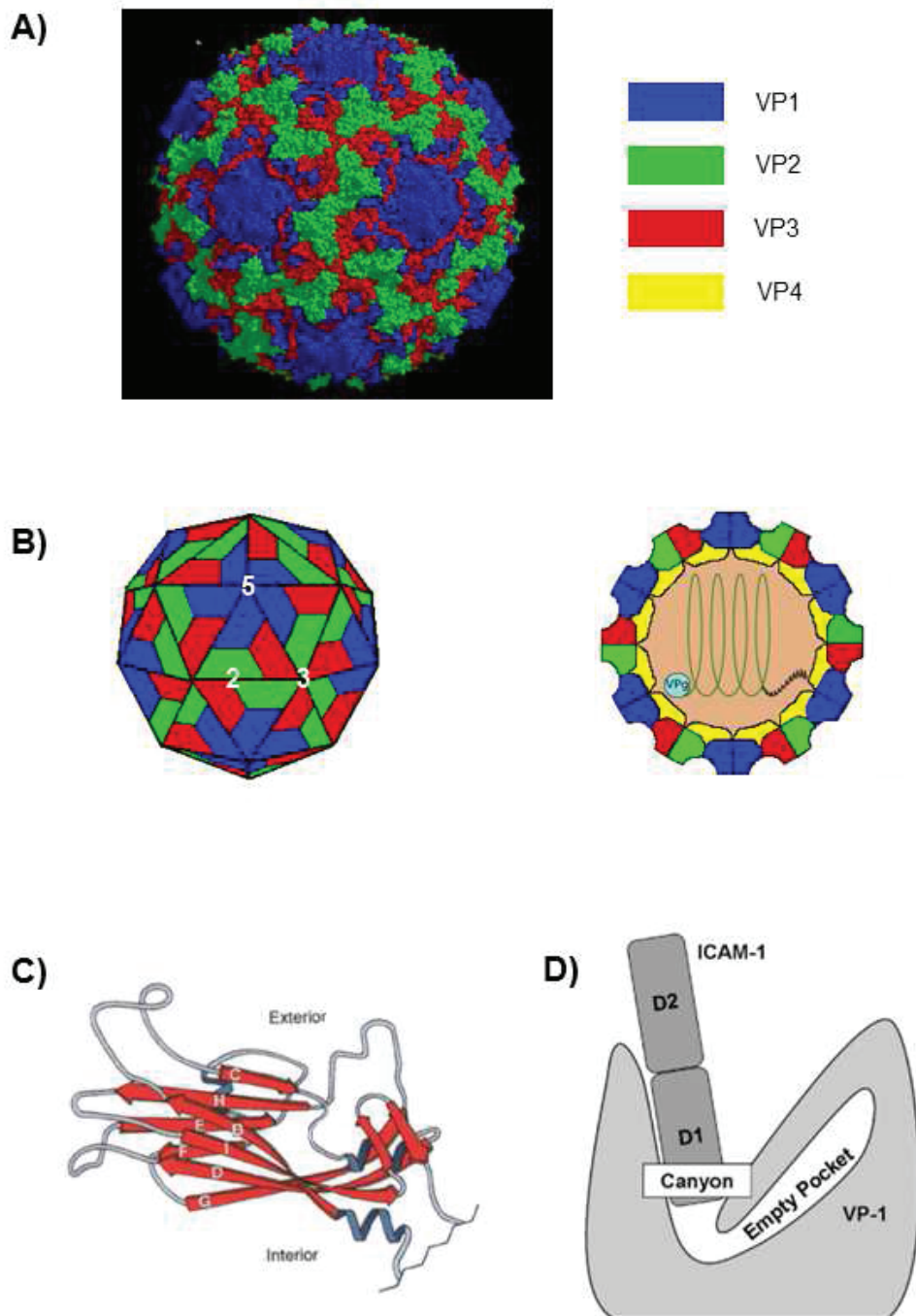


Figure 2. Structure de la capside du Rhinovirus humain

(A) Vue extérieure de la capside virale. Les protéines de capside VP1, VP2 et VP3 sont représentées en bleu, vert et rouge respectivement. Les boucles de la protéine VP1 exposées à la surface forment des plateaux en forme d'étoiles autour des axes de symétrie d'ordre 5. D'après (Oliveira, Zhao et al. 1993).

(B) Représentation schématique de la capside virale. La capside du RVH est formée de 60 protomères. Chaque protomère est constitué des 4 protéines VP1, VP2, VP3 et VP4. Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont localisées à la surface de la particule virale alors que VP4 est

cristallographie aux rayons X pour plusieurs sérotypes de RVH : RVH-1A, RVH-2, RVH-3, RVH-14 et RVH-16; (Rossmann, Arnold et al. 1985; Kim, Smith et al. 1989; Oliveira, Zhao et al. 1993; Zhao, Pevear et al. 1996; Hadfield, Lee et al. 1997). La capside du RVH est formée de 60 protomères, chacun étant constitué de 4 protéines (VP1 à VP4). Les protomères sont quant à eux organisés en 12 pentamères (**Figure 2**). VP1, 2 et 3 (environ 250 résidus et 35 kDa chacune) sont localisées à la surface du virus (**Figure 2A**). Elles possèdent une extrémité C-terminale externe et sont responsables des différentes interactions externes et antigéniques. Les protéines VP1 sont réparties autour des axes de symétrie d'ordre 5, alors que les protéines VP2 et VP3 alternent autour des axes de symétrie d'ordre 3 (**Figure 2B**). Les trois protéines de surface ne présentent pas d'homologie de séquence mais possèdent en revanche la même topologie : elles sont formées d'un barillet β composé de deux hélices α et de 8 brins β anti-parallèles reliés entre eux par des boucles de connexion (**Figure 2C**). Les brins bêta forment le squelette de la capside tandis que la majorité des boucles de connexion et les extrémités C-terminales des protéines sont exposées à la surface de la capside. Ces résidus exposés en surface constituent des sites antigéniques de fixation des anticorps monoclonaux neutralisants (Sherry, Mosser et al. 1986). De plus, toutes les structures de RVH identifiées montrent qu'au niveau de chaque axe de symétrie d'ordre 5, existe une dépression ou « canyon » d'environ 2 nm de profondeur et 1,5 à 3,5 nm de largeur. Il a été suggéré puis démontré que cette dépression constitue le site d'attachement aux récepteurs humains du rhinovirus (Olson, Kolatkar et al. 1993). A la base du canyon, se trouve une poche hydrophobe parfois occupée par un ligand lipidique et qui constitue le site de fixation de certains antiviraux (**Figure 2D**).

située du côté interne. Les protéines VP1 sont organisées autour des axes de symétrie d'ordre 5 et les protéines VP2 et VP3 alternent autour des axes de symétrie d'ordre 3. (d'après viralzone.expasy.org)

(C) Topologie de la structure en barillet bêta de la protéine VP1 du RVH-14. Les huit feuillets bêta anti-parallèles sont indiqués par les flèches rouges nommées B à I. Adaptée de (Rossmann, Olson et al. 1994).

(D) Représentation schématique de la fixation du récepteur cellulaire du RVH au niveau de la dépression ou « canyon » formée par la protéine VP1. Sous le canyon, est localisée une poche hydrophobe, site de fixation de certaines molécules antivirales. (De Palma, Vliegen et al. 2008)

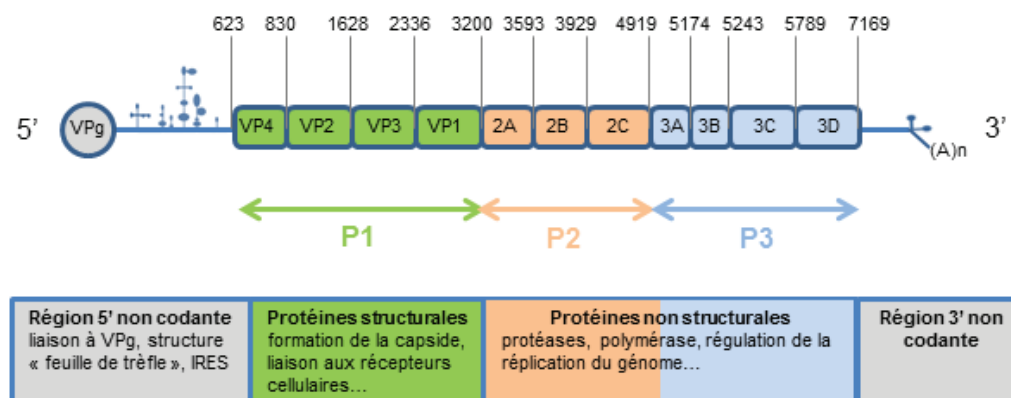


Figure 3. Organisation génomique des rhinovirus.

Deux régions non codantes en 5' et 3' encadrent une phase de lecture unique codant pour une polyprotéine dont la maturation génère l'ensemble des protéines virales. La région P1 code pour les protéines de capside et les régions P2 et P3 codent les protéines non structurales. La région 5' contient un motif « feuille de trèfle » et un IRES et est liée de manière covalente à la protéine virale VPg (ou 3B). La région 3' contient une structure de type tige-boucle et est polyadénylée. Adapté de (Cordey 2008; Palmenberg, Rathe et al. 2010).

VP4, localisée du côté interne, reste en étroite association avec l'ARN et établit un réseau d'interactions avec les parties N-terminales de VP1, VP2 et VP3 (**Figure 2B**). VP4 est myristylée à son extrémité N-terminale ce qui joue un rôle essentiel dans la morphogénèse et la stabilité de la capsid (Chow, Newman et al. 1987).

1.2.2. Génome viral

Le génome du rhinovirus est une molécule d'ARN simple brin, non coiffée, de polarité positive, d'environ 7200 nucléotides. Il est infectieux et sert de messenger lors de la traduction ou de matrice pour la formation du brin complémentaire de polarité négative lors de la réplication virale. Le génome peut être divisé en trois parties distinctes (**Figure 3**) : une région 5' non traduite (5'NTR) impliquée dans la réplication et la traduction de l'ARN viral, un seul cadre de lecture ouvert, une région 3' non traduite (3'NTR) polyadénylée et essentielle entre autres pour assurer l'efficacité de la réplication virale.

La région 5' non codante d'environ 650 nucléotides est liée de façon covalente à une petite protéine basique virale nommée VPg (ou 3B). La partie 5'NTR contient (**Figure 4A**) : (i) une structure dite en « feuille de trèfle » (« clover leaf ») qui interagit avec la protéine cellulaire PCBP2 (poly(rC)-binding protein 2) et la protéine virale 3CD pour former un complexe essentiel à la réplication du génome viral et à la régulation des processus de traduction et de réplication (Huang, Alexandrov et al. 2001; Perera, Daijogo et al. 2007), (ii) un site interne d'entrée du ribosome (IRES) de type I qui permet le recrutement de la machinerie de traduction en absence de coiffe (Todd, Towner et al. 1997).

La région 3' non codante d'environ 50 nucléotides (**Figure 4B**), contient une structure secondaire de type tige-boucle qui joue un rôle essentiel dans l'efficacité de réplication du génome (Pilipenko, Poperechny et al. 1996; Zoll, Heus et al. 2009). Plusieurs études ont montré que la région 3'NTR interagit avec la protéine cellulaire Sam68 dont le rôle dans la réplication de l'ARN viral reste inconnu (Todd, Nguyen et al. 1995; Mellits, Meredith et al. 1998).

La phase ouverte de lecture code pour une polyprotéine d'environ 2 200 acides aminés qui est divisée en trois sous-régions (P1, P2 et P3) (**Figure 3**). La région P1 code pour les quatre protéines de capsid VP1 à VP4. Les régions P2 et P3 codent pour l'ensemble

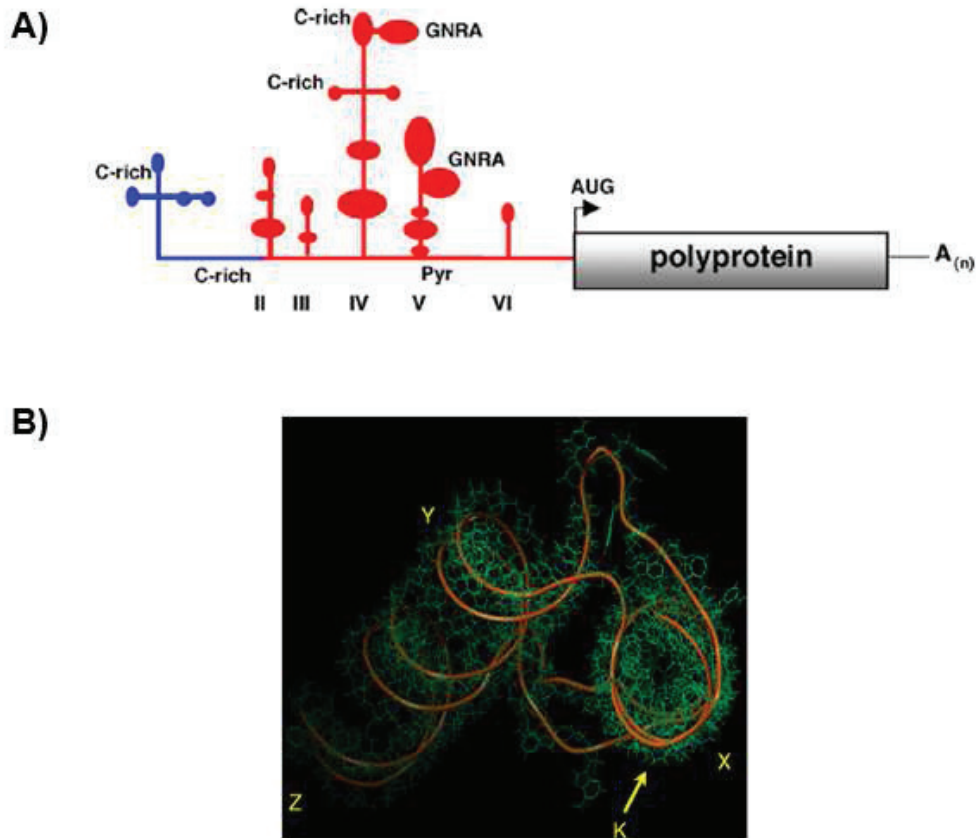


Figure 4. Structure des régions 5' et 3' non codantes du génome des entérovirus.

(A) Représentation schématique de la structure secondaire de la région 5' non codante (NC) du génome du rhinovirus. La région 5'NC contient une structure en « feuille de trèfle » (en bleu) et un site interne d'initiation de la traduction (IRES, en rouge). L'IRES contient 5 structures en tige-boucle (numérotées II à VI), trois motifs riches en cytosine (C-rich), deux structures de type GNRA (ou N est A, G, C ou U et R est A ou G) et un domaine riche en pyrimidine. D'après (Fernandez-Miragall, Lopez de Quinto et al. 2009).

(B) Représentation tridimensionnelle de la région 3'NC du coxsackievirus B3. Les boucles X et Y interagissent pour former une structure de type « kissing » (K). D'après (Zoll, Heus et al. 2009).

des protéines non structurales impliquées dans les clivages protéolytiques, la réplication du génome viral et l'inhibition des fonctions cellulaires. La partie codante du génome viral présente également des structures tige-boucle appelées éléments CRE (cis-acting replication element) découvertes pour la première fois dans la séquence codant pour la protéine VP1 du rhinovirus 14. La structure CRE, qui sert de matrice pour le processus d'uridylylation de la protéine VPg (ajout de deux UTPs sur une tyrosine conservée de VPg par la polymérase virale 3D^{pol}), est essentielle à la réplication de l'ARN viral (McKnight and Lemon 1996; McKnight and Lemon 1998). De plus, la position du motif CRE sur le génome viral est caractéristique des différentes espèces de rhinovirus (**Figure 5**) (Tapparel, Junier et al. 2007).

1.2.3. Classification des rhinovirus et identification de nouvelles espèces

1.2.3.1. Classification basée sur le séquençage

Le RVH a été isolé pour la première fois en 1956 à partir d'un patient atteint d'un rhume. Entre 1956 et 1987, 101 sérotypes de RVH ont été identifiés sur la base de cultures sur cellules de type WI-38 puis de tests de séroneutralisation. Par la suite, le séquençage des régions codantes VP4/VP2 et VP1 a permis de classer ces sérotypes en deux groupes RVH-A (74 sérotypes) et RVH-B (25 sérotypes) (Savolainen, Blomqvist et al. 2002; Ledford, Patel et al. 2004; Laine, Blomqvist et al. 2006). Ce type d'analyse a révélé de plus que certains sérotypes tels que RVH-95 et RVH-8 ou RVH-Hanks et RVH-21 représentent un seul et unique sérotype et que le sérotype RVH-87 est en fait membre des entérovirus de type D (EV-68) (Blomqvist, Savolainen et al. 2002; Savolainen, Blomqvist et al. 2002; Ledford, Patel et al. 2004). Les RVH étaient alors classés dans la famille des picornavirus mais dans un genre distinct des entérovirus. Par la suite, des études phylogénétiques ont montré que si l'ensemble du génome est pris en compte, les RVH-A et B ne sont pas plus proches entre eux qu'ils ne le sont des EV (Savolainen, Laine et al. 2004; Laine, Blomqvist et al. 2006; Tapparel, Junier et al. 2007). C'est pourquoi en 2009, le Comité International de Taxonomie Virale (ICTV) a proposé de combiner les RVH et EV en un genre unique nommé entérovirus.

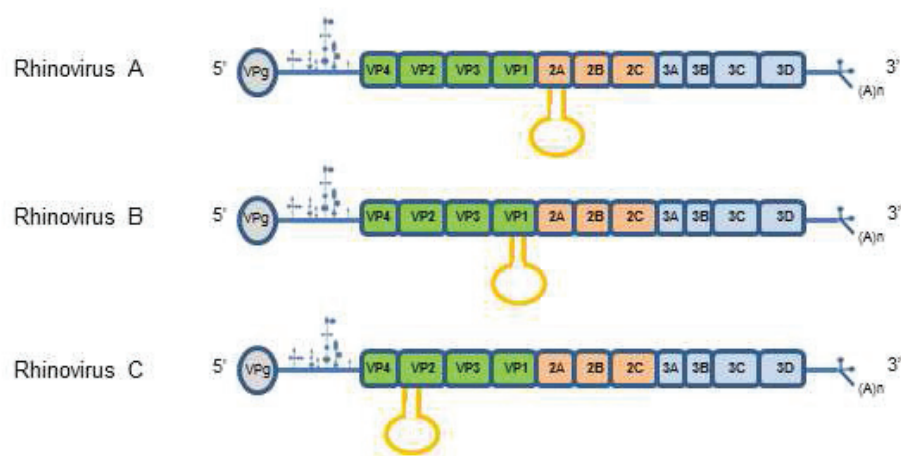


Figure 5. Position du motif CRE en fonction du groupe de RVH.

Le motif CRE (en jaune) des RVH-A, -B et -C est respectivement localisé dans les régions 2A, VP1 et VP2 du génome viral.

Depuis 2006, plusieurs RVH divergents ont été isolés et classés dans un nouveau groupe : les RVH-C (Kistler, Webster et al. 2007; Lau, Yip et al. 2007; McErlean, Shackelton et al. 2007; Briesse, Renwick et al. 2008). Ce groupe, qui compte plus de 50 membres, est plus proche des RVH-A que des RVH-B. En 2009, l'analyse de tous les génomes de RVH connus a permis d'identifier un 4^{ème} groupe de RVH nommé RVH-D (Palmenberg, Spiro et al. 2009; Palmenberg, Rathe et al. 2010; Rathe, Liu et al. 2010).

1.2.3.2. La position de la structure CRE dans le génome viral permet de classer les RVH

La classification des RVH fondée sur le séquençage de leur génome corrèle parfaitement avec une classification fondée sur la localisation du motif CRE se trouvant dans la région 2A pour l'ensemble des rhinovirus de type A, dans la région VP1 pour les RVH de type B et dans la région VP2 pour les RVH-C (Tapparel, Junier et al. 2007; Cordey, Gerlach et al. 2008) (**Figure 5**). La position du motif CRE pour les RVH-D n'a pas encore été décrite.

1.2.3.3. Classification selon le type de récepteurs cellulaires

Les RVH peuvent également être répartis en deux groupes selon leur type de récepteurs cellulaires. Le groupe « majeur » (65 RVH-A et 25 RVH-B) a pour récepteur cellulaire CD54 (cluster of differentiation 54) encore appelé ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), une molécule appartenant à la famille des immunoglobulines (Tomassini, Graham et al. 1989). Le groupe « mineur » regroupe 12 sérotypes de RVH-A (RVH-1A, RVH-1B, RVH-2, RVH-23, RVH-25, RVH-29, RVH-30, RVH-31, RVH-44, RVH-47, RVH-49, RVH-62) et se lie au LDLR (low density lipoprotein receptor) (Hofer, Gruenberger et al. 1994). Le récepteur cellulaire des RVH-C et -D n'a pas encore été identifié.

1.2.4. Evolution des rhinovirus

La 3D^{pol} du RVH ne possède pas de propriété de « relecture », ce qui explique les mutations fréquentes au cours de la réplication du génome viral. Le taux d'erreurs de l'ARN polymérase des picornavirus est compris entre 10^{-4} et 10^{-3}

erreur/nucléotide/cycle de réplication (Drake 1999; Harvala and Simmonds 2009). L'accumulation de mutations ainsi que les événements de recombinaison représenteraient des forces évolutives majeures à l'origine de la diversité des rhinovirus (Tapparel, Junier et al. 2009; Palmenberg, Rathe et al. 2010). Ces modes évolutifs peuvent conduire à échapper à une pression environnementale telle que celle occasionnée par un antiviral. Il a ainsi été montré que chez des patients infectés par le RVH et traités par du pleconaril (une forme soluble de ICAM-1), 13 % d'entre eux développaient des résistances (Hayden, Herrington et al. 2003; Pevear, Hayden et al. 2005). Le séquençage du génome entier de 99 sérotypes de RVH a montré que les régions les moins conservées sont celles codant pour les protéines de capsid VP2, VP3 et VP1 (Palmenberg, Rathe et al. 2010). En 2010, Cordey et *al* ont publié une étude dans laquelle 15 volontaires ont été infectés expérimentalement par du RVH-39 et leurs lavages nasaux ont été analysés 5 jours post-infection. Le séquençage de ces échantillons a permis de détecter des mutations principalement localisées dans les régions VP2, VP3, VP1, 2C et 3C. Le taux de mutations sur l'ensemble du cadre ouvert de lecture a été estimé à 3.4×10^{-4} mutations/nucléotides (Cordey, Junier et al.).

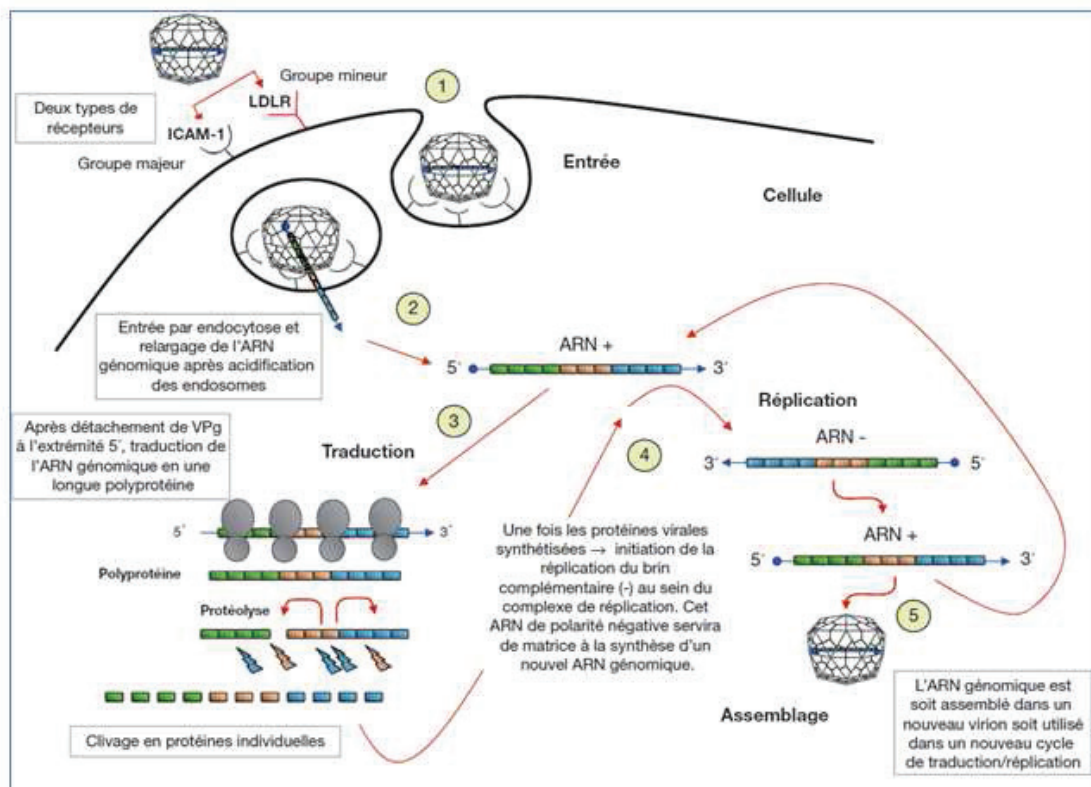


Figure 6. Cycle de réplication des rhinovirus.

- 1) Attachement et entrée du virus dans la cellule hôte;
- 2) Relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme;
- 3) Traduction et maturation de la polyprotéine virale;
- 4) Réplication du génome viral;
- 5) Assemblage.

D'après (Cordey 2008).

1.3. Cycle de multiplication virale

Le cycle infectieux des rhinovirus est similaire à celui de l'ensemble des picornavirus et se déroule uniquement dans le cytoplasme des cellules infectées. La première étape consiste en l'attachement de la particule virale au récepteur cellulaire. La particule virale pénètre ensuite dans la cellule par endocytose puis la capsid est dissociée et l'ARN viral relâché dans le cytoplasme. A l'intérieur du cytoplasme, le génome viral recrute la machinerie cellulaire de traduction permettant la synthèse de la polyprotéine. Cette dernière est clivée en *cis* et en *trans* par les protéases virales 2A et 3C ce qui conduit à la formation des protéines virales individuelles. Une fois les protéines virales nécessaires à la réplication présentes en quantité suffisante, une copie complète de l'ARN génomique est synthétisée par la polymérase virale 3D^{pol}. Ce brin complémentaire de polarité négative sert à son tour de matrice pour la synthèse de nouveaux brins positifs qui sont alors associés aux protéines structurales néosynthétisées pour former de nouvelles particules virales (**Figure 6**).

1.3.1. Récepteurs cellulaires

1.3.1.1. Le récepteur ICAM-1

ICAM-1 ou CD54 est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines. ICAM-1 est impliqué dans les interactions cellule-cellule et dans la réponse à l'inflammation (van de Stolpe and van der Saag 1996). ICAM-1 se lie également aux érythrocytes infectés par le parasite de la malaria, *Plasmodium falciparum* (Berendt, McDowall et al. 1992; Ockenhouse, Betageri et al. 1992). L'expression de ce récepteur dans divers types cellulaires peut être contrôlée par des facteurs intercellulaires tels que les cytokines ainsi que par l'infection à RVH (van de Stolpe and van der Saag 1996; Roebuck and Finnegan 1999; Papi, Stanciu et al. 2000). ICAM-1 est localisé au niveau de la membrane plasmique et possède cinq domaines « immunoglobulin-like » extracellulaires nommés D1 à D5, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal cytoplasmique (**Figure 7A**) (Simmons, Makgoba et al. 1988; Staunton, Marlin et al. 1988). Les domaines D2, D3 et D4 sont glycosylés et le domaine D1 contient le site de fixation à la particule virale (Simmons, Makgoba et al. 1988; Lineberger, Graham et al. 1990; McClelland, deBear et al. 1991).

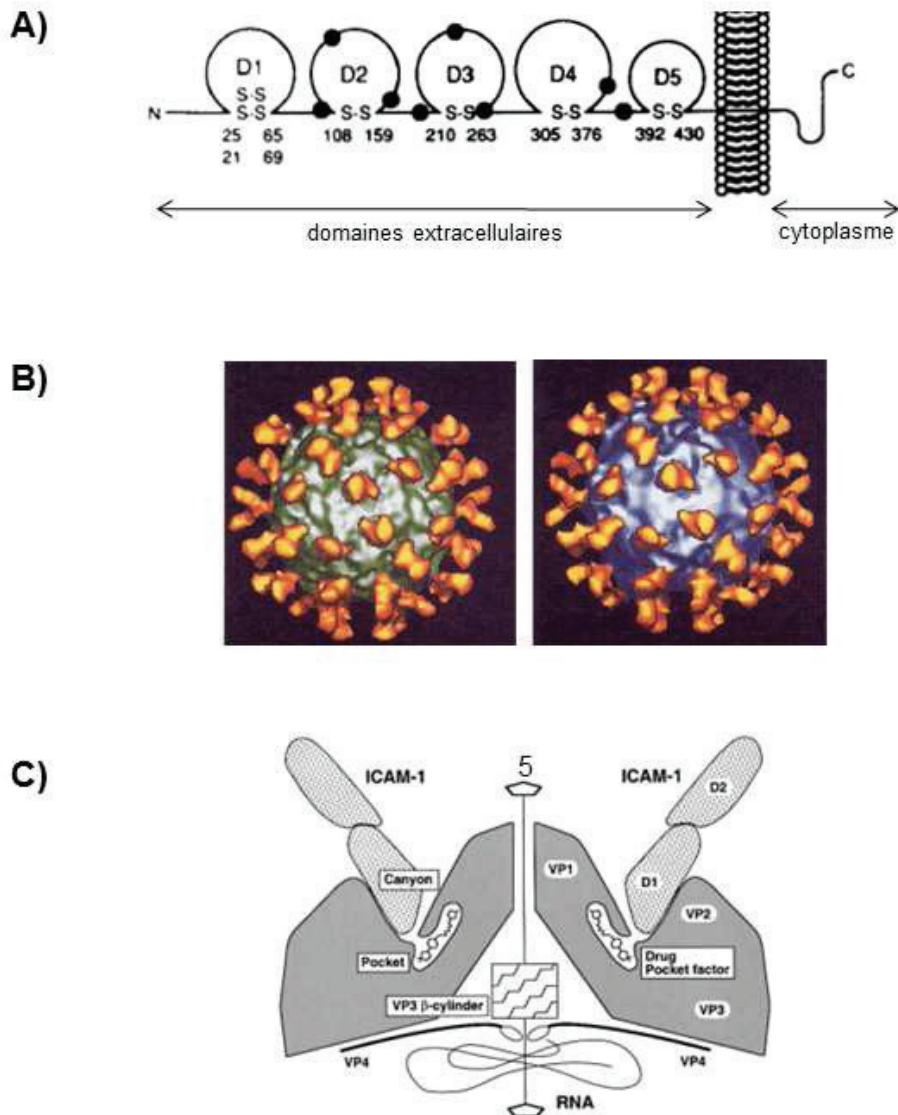


Figure 7. Structure du récepteur ICAM-1 et représentation du complexe formé avec le RVH.

(A) Structure schématique de ICAM-1. Les cinq domaines extracellulaires (D1 à D5), le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique sont représentés. Les points noirs indiquent les sites potentiels de glycosylation. Les positions des résidus cystéine impliqués dans la formation des ponts disulfures sont également indiquées. (adaptée de Rossmann, 1994)

(B) Image de microscopie cryoélectronique des complexes formés par le RVH-16 (en vert) ou le RVH-14 (en bleu) avec le fragment D1-D2 de ICAM-1 (en orange). (d'après Rossmann, 1994)

(C) Représentation schématique de l'interaction de ICAM-1 avec les RVH du groupe majeur. Seuls les domaines D1 et D2 de ICAM-1 sont représentés. (d'après Kolatkar et al., 1999)

La détermination par microscopie cryoélectronique des structures des complexes formés par les RVH-16 et -14 avec la portion D1-D2 de ICAM-1 d'une part et du RVH-16 avec le fragment D1-D5 d'autre part (**Figure 7B**) ainsi que les mutations ponctuelles des résidus du canyon de la particule virale ont permis de montrer que les fragments d'ICAM-1 : (i) se fixent à la capsid au niveau du canyon, (ii) sont orientés perpendiculairement à la surface du virus (**Figure 7C**) et (iii) interagissent avec les résidus localisés au niveau du plancher du canyon (**Tableau 3**) (Colonno, Condra et al. 1988; Olson, Kolatkar et al. 1993; Bella, Kolatkar et al. 1999; Kolatkar, Bella et al. 1999).

Un variant naturel de ICAM-1, ICAM-1^{kilifi} dans lequel la lysine 29 est remplacée par une méthionine a été décrit chez certaines populations africaines (Karttunen, Poyry et al. 2003). Les individus homozygotes pour l'allèle portant la variation K29M sont plus sensibles à la malaria causée par le *P. falciparum* mais sont très résistants par contre à une infection par le RVH-16 (Fernandez-Reyes, Craig et al. 1997; Craig, Fernandez-Reyes et al. 2000; Xiao, Tuthill et al. 2004).

1.3.1.2. Le récepteur LDL

La famille des récepteurs LDL comprend différents membres parmi lesquels le LDLR, le very-LDLR (VLDLR) et les LDLR-related protein (LRP).

Les récepteurs LDL sont des protéines transmembranaires localisées au niveau de la membrane plasmique. La région N-terminale extracellulaire de LDLR, VLDLR et LRP est composée (**Figure 8A**) : (i) d'une répétition de 7, 8 et 31 modules respectivement, riches en cystéine et contenant chacun environ 40 résidus, 3 ponts disulfures et une liaison à un ion Ca^{2+} . Cette région de la protéine constitue le domaine de liaison à la particule virale, (ii) d'un domaine homologue au précurseur de l'EGF (epidermal growth factor) et (iii) un domaine glycosylé (Bieri, Djordjevic et al. 1995; Fass, Blacklow et al. 1997). Le domaine cytoplasmique contient les signaux d'internalisation (NPXY et YXXL) par les vésicules recouvertes de clathrine (Herz 2001).

Plusieurs études ont permis de mieux caractériser les interactions qui s'établissent entre les RVH du groupe mineur et les récepteurs LDL. En particulier, la structure 3D du complexe formé par RVH-2 et un fragment de VLDLR comprenant les modules

Résidus de ICAM-1	Résidus de RVH-14	Résidus de RVH-16
• Asp26, Asp71	• Lys1280 • Lys1283 • Lys 3089 • Asp3093	• Arg1277 • His3092 • Lys3231
• Lys29	• His1220 • Asp3177 • Asp3179	• Arg1205 • Asp1213 • Asp3181
• Glu34, Lys77	• Glu1210 • Lys2143	• Glu2163 • Lys2164
• Glu41, Lys50	• Lys1103 • Glu3236	

Tableau 3. Résidus de ICAM-1 et du canyon des RVH-14 et RVH-16 impliqués dans la formation du complexe récepteur/virus.

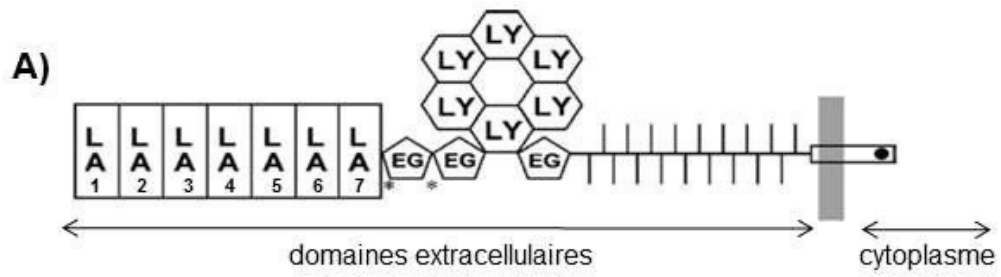
D'après (Colonno, Condra et al. 1988; Kolatkar, Bella et al. 1999; Xiao, Tuthill et al. 2004).

N-terminaux 2 et 3 ou 1, 2 et 3 montre que le récepteur interagit avec la particule virale autour de l'axe de symétrie d'ordre 5 et au niveau des boucles BC, DE et HI de la protéine VP1 (**Figures 8B à 8E**) (Hewat, Neumann et al. 2000; Neumann, Moser et al. 2003; Verdaguer, Fita et al. 2004; Querol-Audi, Konecsni et al. 2009). L'attachement de la particule virale au récepteur nécessite (i) l'interaction de la lysine localisée dans la boucle HI de VP1 (K224 chez RVH-2) présente chez tous les RVH du groupe mineur et 10 RVH du groupe majeur avec un résidu tryptophane largement conservé au sein de la famille des récepteurs LDL et (ii) une complémentarité des charges (les domaines de liaison du récepteur étant globalement chargés négativement) favorisant les liaisons électrostatiques (Kim, Smith et al. 1989; Duechler, Ketter et al. 1993; Vlasak, Blomqvist et al. 2003).

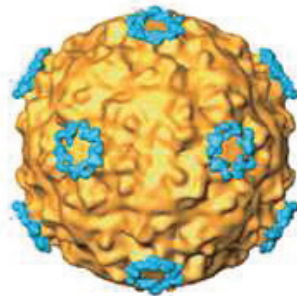
1.3.2. Adsorption, pénétration, décapsidation

Les RVH entrent par endocytose dans la cellule après fixation sur leur récepteur (**Figures 9A et 9B**). Chez les RVH du groupe majeur, l'interaction de la particule virale avec ICAM-1 dans l'endosome de pH acide initie d'importants changements conformationnels nécessaires à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme des cellules infectées : c'est l'étape de décapsidation. Ces changements sont principalement caractérisés par la perte de la protéine VP4 et l'externalisation de l'extrémité N-terminale de la protéine VP1. Par contre, chez les RVH du groupe mineur, les récepteurs LDL ne semblent pas intervenir dans le processus de décapsidation (Neubauer, Frasel et al. 1987).

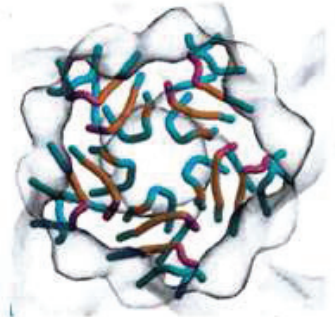
Les différentes étapes du changement conformationnel de la capside peuvent être suivies par sédimentation sur gradient de sucrose (Lonberg-Holm and Korant 1972) (**Figure 9C**). Alors que la particule native présente un coefficient de sédimentation de 160S, la particule obtenue après la perte de VP4 (particule A) présente un coefficient de 135S, est plus hydrophobe que la particule native et est plus sensible aux protéases. Elle a la propriété de s'attacher aux liposomes *via* l'extrémité N-terminale de VP1 (Fricks and Hogle 1990). Après libération de l'ARN viral dans le cytoplasme selon un



B)



C)



D)



E)

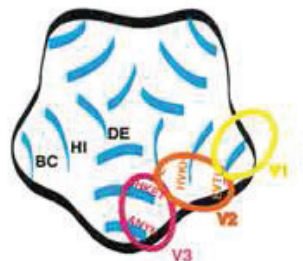


Figure 8. Structure des récepteurs LDL et interaction avec les RVH du groupe mineur.

(A) Structure schématique des récepteurs LDL. LA désigne les modules répétés des récepteurs LDL, EG les modules homologues au précurseur de l'EGF, LY des séquences répétées contenant le motif consensus YWTD. (adaptée de Jeon et al. 2005)

(B) Reconstitution du complexe formé par RVH-2 et les modules 1, 2 et 3 du VLDLR. Vue selon un axe de symétrie d'ordre 2. En jaune, est représentée la particule virale et en bleu, le fragment de récepteur. (d'après Neumann et al. 2003)

(C) Vue selon un axe de symétrie d'ordre 5 de la structure du RVH-2 déterminée en microscopie cryoélectronique. Les empreintes des modules 2 (en orange) et 3 (en magenta) du VLDLR sur VP1 (en bleu) sont identifiées. (d'après Neumann et al. 2003)

(D) Modèle d'interaction de VLDLR sur RVH-2. Les modules 2 et 3 (nommés V2 et V3) interagissent avec VP1. (d'après Neumann et al. 2003)

(E) Représentation schématique des empreintes des modules 1, 2 et 3 (V1 à V3) sur RVH-2. Les résidus de VP1 impliqués dans l'interaction avec le VLDLR sont également indiqués. (d'après Neumann et al. 2003)

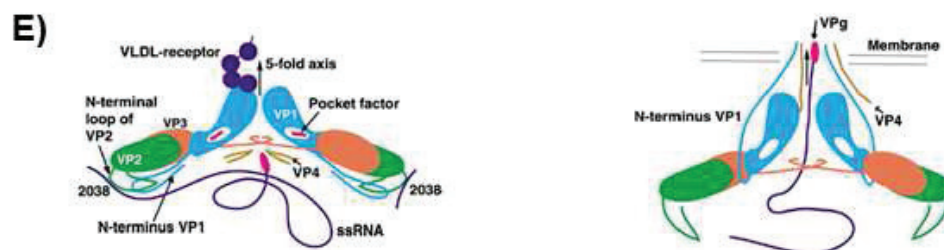
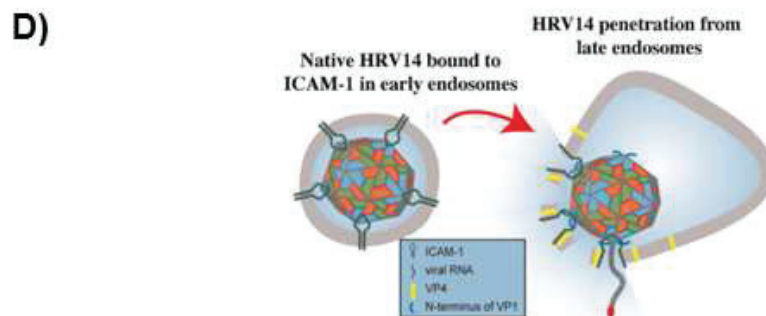
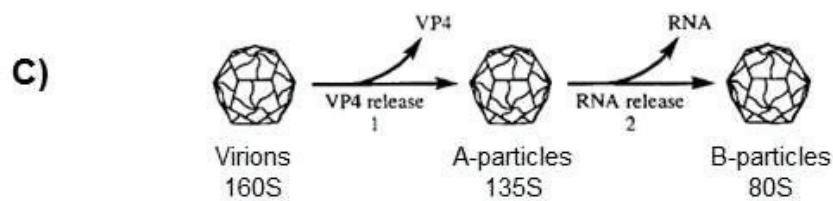
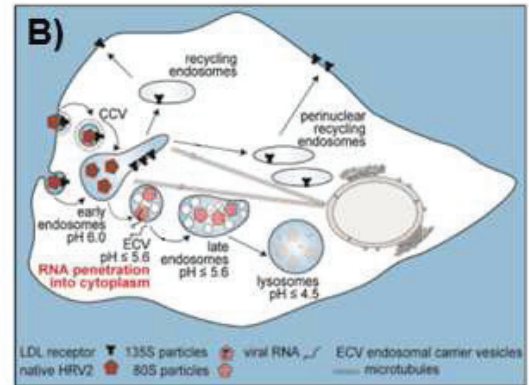
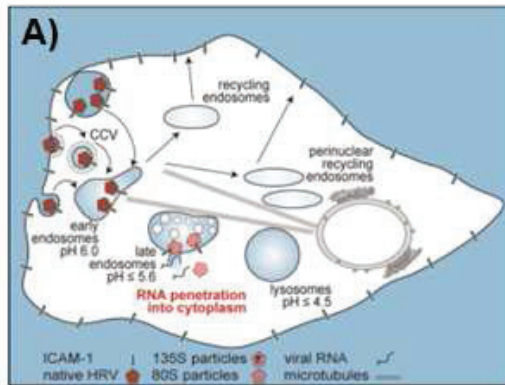


Figure 9. Etapes précoces du cycle de réplication des RVH : adsorption, pénétration, décapsidation.

(A) Entrée et décapsidation du RVH-14, membre du groupe majeur des RVH. Le RVH-14 se fixe sur son récepteur cellulaire ICAM-1 au niveau de la membrane plasmique puis pénètre dans la cellule le plus souvent par endocytose où il se retrouve dans les endosomes précoces. ICAM-1 et le pH acide de l'endosome entraînent la déstabilisation de ce dernier et la libération de l'ARN viral et des protéines de capsidation dans le cytoplasme (d'après Hewat, 2002).

(B) Entrée et décapsidation du RVH-2, membre du groupe mineur des RVH. Le RVH-2 fixe les récepteurs LDL et entre par endocytose dépendante ou non de la clathrine. Dans les endosomes précoces, le pH acide entraîne des changements conformationnels de la capsidation et la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. Les capsides vides sont dégradées dans les lysosomes (adapté de Hewat, 2002).

(C) Schéma des différentes étapes de la décapsidation du RVH. La première étape de la décapsidation consiste en la libération de la protéine de capsidation VP4. Le virion mature d'un coefficient de 160S devient alors une particule de type A de 135S. La deuxième étape repose sur la libération de l'ARN viral et la formation de particules B de 80S (adapté de Rossmann 1994).

(D) Modèle de la libération de l'ARN viral chez le RVH-14 (groupe majeur). Une fois libérée, VP4 (en jaune) pourrait s'insérer dans la membrane de l'endosome et participer à la déstabilisation de la capsidation et à la libération de l'ARN viral. (d'après Hewat, 2002)

(E) Schéma de la réorganisation du RVH-2 durant la libération de l'ARN viral. Dans le virion mature (à gauche), l'ARN est lié à VP2 (en vert) et la poche localisée sous le canyon contient un facteur lipidique. La fixation au récepteur LDL entraîne l'expulsion du facteur lipidique et les protéines VP1 s'écartent pour former un canal de 10 Å de diamètre autour de l'axe de symétrie d'ordre 5 (schéma de droite). Les protéines VP1 et VP4 pourraient former un pore au niveau de la membrane de l'endosome et permettre le relargage de l'ARN viral (d'après Hewat, 2002).

processus mettant en jeu les extrémités N-terminales des protéines VP1 et VP4, la traduction de la polyprotéine virale est initiée.

Chez le membre du groupe majeur RVH-14, Fuchs et Blaas ont proposé un modèle selon lequel une fois libérée, VP4 s'insère dans la membrane de l'endosome et contribue à la déstabilisation de la vésicule (Fuchs and Blaas). L'ARN viral ainsi que l'ensemble des protéines de capsid seraient alors relargués dans le cytosol (**Figures 9A et 9D**).

Chez le membre du groupe mineur RVH-2, l'ARN viral serait libéré soit *via* un canal formé au niveau de la capsid le long de l'axe de symétrie d'ordre 5, soit *via* un canal situé près de l'axe de symétrie d'ordre 2 (**Figure 9E**) (Bostina, Levy et al.; Garriga, Pickl-Herk et al. 2012). La capsid vide serait ensuite dégradée dans les lysosomes (**Figure 9B**).

1.3.3. Traduction de l'ARN viral et maturation de la polyprotéine

L'ARN viral libéré dans le cytoplasme est immédiatement traduit par les ribosomes de la cellule hôte. L'initiation de la traduction se fait selon un mécanisme d' « initiation interne » : la sous-unité 40S du ribosome reconnaît la structure IRES en 5' (**Figures 3 et 4**) puis migre jusqu'à l'AUG initiateur. La traduction requiert ensuite l'ensemble des facteurs d'initiation de la traduction (mis à part eIF4E) (Ohlmann, Rau et al. 1996). D'autres facteurs cellulaires se fixant spécifiquement sur les structures secondaires de la région 5'NC ont été décrits comme pouvant jouer un rôle dans l'activation de la traduction du génome du RVH (Brown and Ehrenfeld 1979; Dorner, Semler et al. 1984; Borman and Jackson 1992; Bailly, Borman et al. 1996; Anderson, Hunt et al. 2007). Parmi ceux-ci, les protéines PTB (polypyrimidine tract-binding protein), Unr (upstream of n-ras), PCBP1 et PCBP2 (Poly(rC) binding protein) agiraient comme des molécules chaperones en se liant à l'ARN messager et pourraient maintenir l'IRES dans une conformation telle qu'il puisse interagir avec la machinerie traductionnelle.

Une fois traduite, la polyprotéine est clivée par les protéases virales 2A, 3CD et 3C pour donner les protéines de capsid et les protéines non structurales (**Tableau 4, Figure 10**). La première étape de maturation de la polyprotéine est assurée par la protéase 2A qui clive en *cis* entre les régions VP1 et 2A. Les étapes suivantes sont assurées par la protéase virale 3C et son précurseur 3CD.

1.3.4. Réplication du génome viral

La description du cycle de réplication du RVH est fondée principalement sur les observations faites dans le cas du virus de la poliomyélite, un autre membre du genre entérovirus. Ainsi, comme pour le poliovirus, la réplication du génome du RVH a lieu dans le cytoplasme de la cellule infectée et nécessite la formation d'un complexe de réplication à la surface externe de vésicules qui bourgeonnent à partir du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des lysosomes (carrasco 2002; Egger and Bienz 2002). Ce complexe est composé d'ARN viral matriciel, de la polymérase virale 3D^{pol} et de membranes cellulaires lisses associées à d'autres protéines virales et cellulaires (**Figure 11**). Le cytoplasme des cellules infectées contient des formes répliquatives (RF) constituées de brins d'ARNs positifs et négatifs appariés en double hélice, et des formes intermédiaires de réplication (RI) constituées d'une matrice d'ARN associée à plusieurs brins de polarité opposée en cours de synthèse.

La réplication implique une première étape de synthèse d'ARN simple brin de polarité négative de séquence complémentaire à celle de l'ARN viral de polarité positive (**Figures 11A et 11B 1.**). Dans ce processus, la protéine cellulaire PABP (Poly-A Binding Protein) se lierait à la queue poly-A en 3' et interagirait avec la protéine virale 3CD et la protéine cellulaire PCBP2 liées à la structure en forme de trèfle en 5' formant ainsi le complexe d'initiation. La formation de ce complexe entraînerait ensuite l'uridylation de VPg (3B) par la 3D^{pol} et la synthèse du brin complémentaire de polarité négative (**Figures 11A et 11B 2.**).

Protéines	Fonctions
VP1 VP2 VP3 VP4	Protéines de capside Assemblage des particules virales Entrée dans la cellule
2A	Clivage de la polyprotéine virale Inhibition de la traduction des ARN messagers cellulaires Altération du transport nucléo-cytoplasmique
2BC	Réplication de l'ARN viral
2B	Altération de la perméabilité membranaire
2C	Libération de l'ARN viral du complexe de réplication Rôle dans les étapes de préparation à l'encapsidation
3AB	Association aux vésicules membranaires de réplication virale Réplication du génome viral Co-facteur de la polymérase virale 3Dpol
3A	Formation des vésicules membranaires de réplication virale
3B	Amorce pour la réplication du génome viral Liée de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral
3CD	Clivage de la polyprotéine virale Réplication du génome viral
3C	Clivage de la polyprotéine virale Inhibition des synthèses cellulaires (shut-off) Clivage de plusieurs protéines cellulaires
3D	ARN polymérase ARN-dépendante Réplication du génome viral Uridylylation de 3B (VPg) Liaison à l'ARN viral et à des facteurs viraux et cellulaires

Tableau 4. Fonctions des protéines du rhinovirus humain.

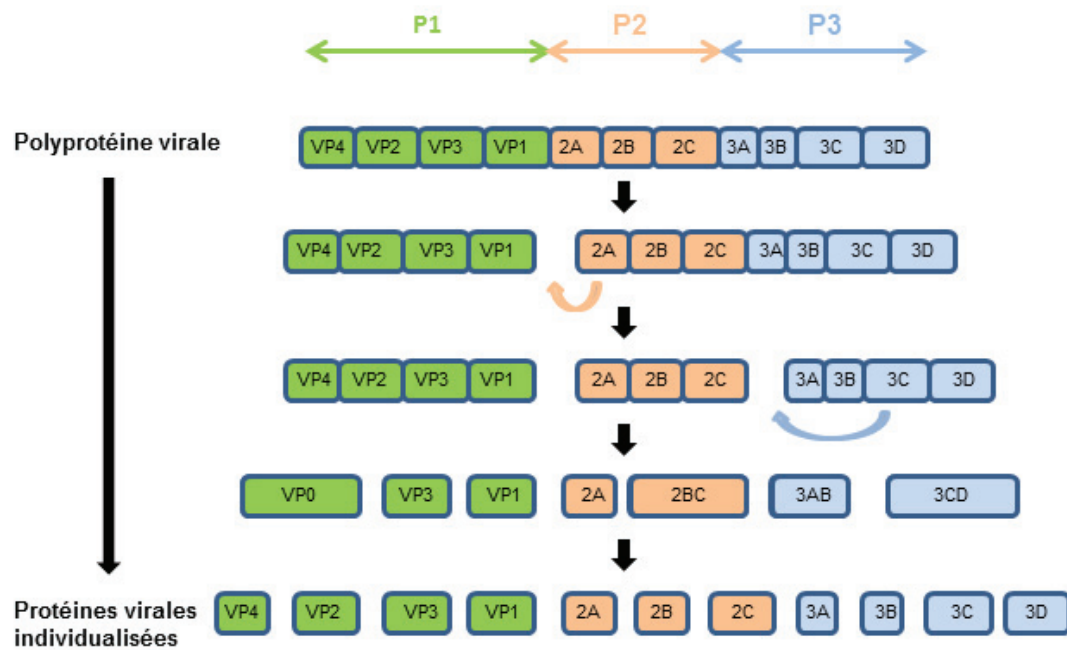


Figure 10. Les différentes étapes de la maturation de la polyprotéine du RVH.

Le premier clivage est assuré par la protéase 2A qui clive en cis entre les régions P1 et P2. La protéase 3C ainsi que le précurseur 3CD assurent ensuite les différentes étapes de clivage de la polyprotéine virale.

A)



B)

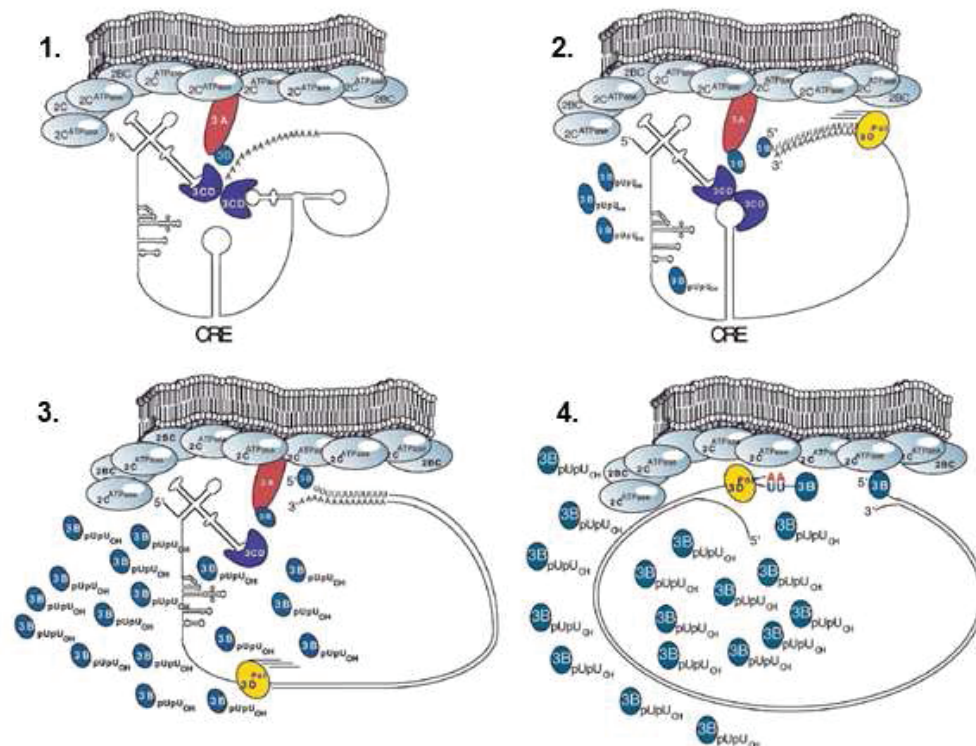


Figure 11. Modèle de la réplication du poliovirus.

(A) Modèle de l'initiation de la synthèse du brin négatif. Les protéines 3CD et PCBP se lient avec la structure en feuille de trèfle en 5' et interagissent avec PABP, elle-même liée à la queue poly-A en 3' entraînant la circularisation de l'ARN viral, l'uridylation de VPg et la synthèse du brin complémentaire. (d'après Herold et al. 2001)

(B) Modèle de la réplication du poliovirus. 1. Initiation de la synthèse du brin négatif. 2. Initiation de l'uridylation de VPg. 3. Finalisation de l'uridylation de la protéine VPg. 4. Initiation de la synthèse du brin positif. (d'après Murray et al. 2003)

Dans un second temps, ce brin néo-synthétisé sert lui-même de matrice pour la synthèse de molécules d'ARN de polarité positive. L'extrémité 5'NC du brin positif de la forme répliquative serait reconnue par les protéines PCBP2 et 3CD en association avec la 3D^{pol} et la 3AB membranaire pour former un complexe au niveau de la structure en forme de trèfle (**Figure 11B 2**) (Andino, Rieckhof et al. 1990). VPg rejoindrait alors ce complexe et la structure CRE servirait de matrice pour l'uridylylation de VPg par la 3D^{pol}. La protéine VPg uridylylée serait utilisée comme matrice pour l'initiation de la synthèse du brin positif (**Figure 11B 4**).

Bien que leurs rôles respectifs ne soient pas clairement établis, les protéines virales 2A, 2B et 2C interviendraient également au cours de la réplication (Johnson and Sarnow 1991; Echeverri and Dasgupta 1995; Li, Lu et al. 2001). La structure en feuille de trèfle de la région 5'NC contiendrait les signaux contrôlant le passage de la traduction vers la réplication du génome viral. En particulier, la protéine PCBP2 qui interagit à la fois avec cette structure et l'IRES en 5' jouerait un rôle clé dans cette transition. En effet, son interaction avec la structure en feuille de trèfle est nécessaire à la réplication du génome et son interaction avec l'IRES est indispensable à la traduction. Il a été démontré que le clivage de PCBP2 par la protéase 3C altère ses propriétés de liaison à l'IRES et inhibe par conséquent son activité de régulation de la traduction sans affecter sa fonction dans la réplication du brin négatif (Perera, Daijogo et al. 2007). L'hydrolyse de PCBP2 par la 3C^{pro} pourrait donc constituer un événement clé de transition entre les étapes de traduction et de réplication du génome viral. De même, ce processus semble également impliquer le clivage de la protéine PTB par la 3C^{pro} (Back, Kim et al. 2002).

1.3.5. Assemblage et libération des virions

La formation des virions est un processus couplé à la réplication de l'ARN et se fait en association avec la membrane des vésicules qui se sont formées au cours de l'infection virale (Pfister, Pasamontes et al. 1992; Hellen C. & Wimmer 1995; Ansardi, Porter et al. 1996).

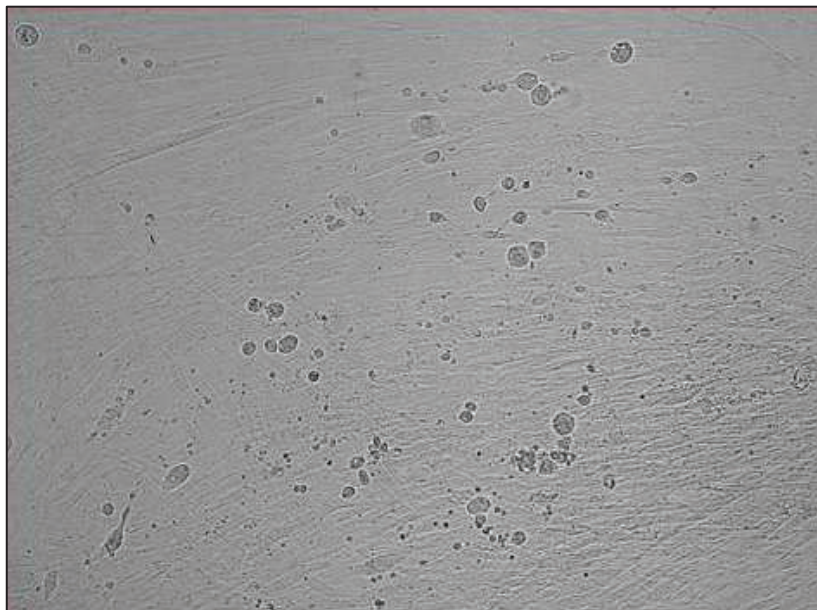


Figure 12. Effets cytopathiques du rhinovirus sur les cellules MRC5 (x 40).
D'après (Billaud G. 2004)

L'assemblage commence par l'association en protomères des protéines de capside VP1 et VP3 avec le précurseur VP0 (Palmenberg 1982). Cinq protomères se combinent ensuite en un pentamère et douze pentamères s'assemblent pour donner la procapside. Nugent et *al* (1999) ont proposé que ces pentamères se condensent autour du génome viral pour donner un provirion (Nugent, Johnson et al. 1999). La dernière étape de la morphogénèse virale correspond au clivage du précurseur VP0 en VP2 et VP4 transformant le provirion en particule virale infectieuse.

Les virions formés s'accumulent dans le cytoplasme des cellules infectées puis sont libérés par éclatement de vacuoles à la surface des cellules et/ou par apoptose (Dunnebacke, Levinthal et al. 1969; Bienz, Egger et al. 1973; Autret, Martin-Latil et al. 2007; Autret, Martin-Latil et al. 2008). Ce processus d'assemblage fait également intervenir des facteurs cellulaires tels que la protéine chaperonne Hsp90 (Geller, Vignuzzi et al. 2007).

1.4. Effets du Rhinovirus sur la cellule hôte

1.4.1. Effets cytopathogènes

Au cours de l'infection par le rhinovirus, d'importants changements morphologiques et métaboliques appelés ECP (Effets CytoPathogènes) interviennent dans la cellule hôte. En culture cellulaire, ces effets se manifestent par l'apparition de foyers constitués de l'association de petites et grosses cellules réfringentes de forme arrondies, ainsi que de noyaux picnotiques et de débris cellulaires disséminés dans la nappe cellulaire (**Figure 12**) (Billaud G. 2004).

1.4.2. Inhibition de la transcription cellulaire

L'infection par le RVH conduit à une inhibition rapide de la synthèse des ARN messagers cellulaires. En particulier, la protéase virale 3C clive les facteurs d'initiation de la transcription TFIID, TFIIC, SL- 1 et UBF (racaniello 2007).

La protéase 3C pourrait entrer dans le noyau *via* son précurseur 3CD en utilisant le signal de localisation nucléaire de la 3D (Amineva, Aminev et al. 2004; Sharma, Raychaudhuri et al. 2004; Ghildyal, Jordan et al. 2009). La 2A^{pro} serait également impliquée dans cette translocation (Tian, Cui et al.).

1.4.3. Inhibition de la traduction coiffe-dépendante

Les protéases 2A et 3C clivent par ailleurs des facteurs d'initiation de la traduction des ARN messagers coiffés. La protéase 2A clive les facteurs eIF4GI et eIF4GII et la PABP est clivée à la fois par la 2A^{pro} et la 3C^{pro} (Lamphear, Kirchweiger et al. 1995; Kerekatte, Keiper et al. 1999). Le rôle de la protéase 2A dans l'inhibition de la traduction des ARN messagers cellulaires est décrit plus en détails dans la 2^{ème} partie de l'introduction.

1.4.4. Altération du transport nucléo-cytoplasmique

La 2A^{pro} du RVH est directement impliquée dans le clivage des protéines du pore nucléaire Nup62, Nup98 et Nup153 perturbant ainsi le trafic entre cytosol et noyau de plusieurs protéines telles que la nucléoline, Sam68, La et hnRNP- C (heterogenous nuclear ribonucleoprotein) (Park, Skern et al.; Meerovitch, Svitkin et al. 1993; McBride, Schlegel et al. 1996; Waggoner and Sarnow 1998; Gustin and Sarnow 2001; Park, Katikaneni et al. 2008). Le trafic des ARN messagers néosynthétisés et des ARN ribosomiques est également perturbé (Castello, Izquierdo et al. 2009).

1.4.5. Altération des membranes cellulaires

L'infection par le RVH induit la formation de domaines fonctionnels au niveau de la membrane plasmique (Dreschers, Franz et al. 2007). En particulier, ces « radeaux lipidiques » sont riches en glycosphingolipides et sont essentiels à l'entrée du virus dans la cellule. Par analogie avec le poliovirus, les membranes intracellulaires des cellules infectées par le RVH sont également remodelées au cours de l'infection. Les protéines

virales 2BC et 3A induisent la formation de vésicules membranaires dérivées du RE et de l'appareil de Golgi nécessaires à la réplication du RVH (Cameron, Oh et al.; den Boon, Diaz et al.; Miller and Krijnse-Locker 2008).

1.4.6. Inhibition du transport protéique entre le RE et l'appareil de Golgi

Par analogie avec le poliovirus, l'infection par le RVH pourrait provoquer un arrêt du transport protéique intracellulaire entre le RE et l'appareil de Golgi (Beske, Reichelt et al. 2007). Il a notamment été démontré que la protéine 2B du RVH perturbe le transport protéique (de Jong, de Mattia et al. 2008). La protéine 3A seule semble également capable d'inhiber les voies de transport protéique *via* l'inhibition de la protéine cellulaire LIS1, un composant du complexe moteur dynéine/dynactine impliqué dans le transport dépendant des microtubules (Doedens and Kirkegaard 1995; Doedens, Giddings et al. 1997; Kondratova, Neznanov et al. 2005).

La perturbation des voies de trafic protéique intracellulaire inhibe la sécrétion des interleukines IL-6 et IL-8 et de l'interféron ainsi que la présentation des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) à la surface des cellules infectées (Deitz, Dodd et al. 2000; Dodd, Giddings et al. 2001). Ceci pourrait contribuer à la réduction des réponses inflammatoires et immunitaires dirigées contre le RVH.

1.4.7. Inhibition de la réponse antivirale

Dans les cellules infectées par le poliovirus, la réponse antivirale est inhibée *via* l'inhibition de la sécrétion des protéines pro-inflammatoires et de la réponse interféron. En particulier, l'infection par le poliovirus induit le clivage des hélicases MDA-5 et RIG-I qui jouent un rôle de senseur des ARN bicaténaires dans la réponse antivirale médiée par les interférons alpha et bêta (Barral, Morrison et al. 2007; Barral, Sarkar et al. 2009). En ce qui concerne le RVH, il a été démontré que le récepteur TLR-3 et la protéine MDA-5 jouent un rôle essentiel dans la détection du RVH par le système immunitaire (Wang, Nagarkar et al. 2009).

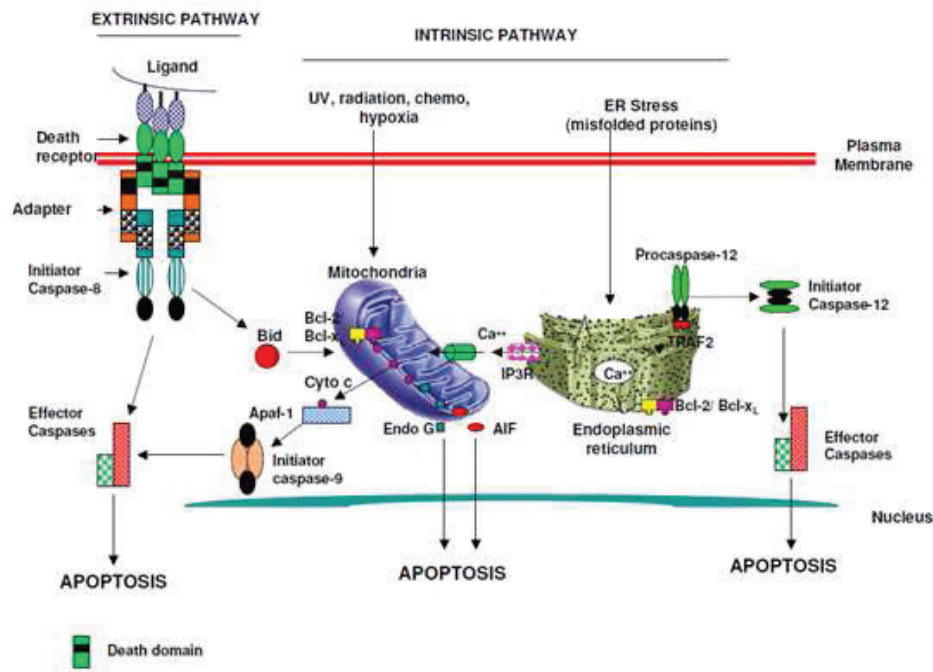


Figure 13. Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose. (d'après Gupta et al. 2006)

Chez les mammifères, les voies apoptotiques conduisant à la mort cellulaire sont généralement divisées en deux cascades de signalisation : la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque qui inclut la voie mitochondriale et la voie du stress réticulaire. La voie des récepteurs de mort est activée par la fixation d'un ligand comme le TNFalpha (Tumor Necrosis Factor alpha) ou FasL (Fas Ligand) sur leurs récepteurs respectifs, TNFR (TNF receptor) et Fas. L'apoptose médiée par les voies mitochondriale et du stress réticulaire résultent de stress cellulaires comme certaines infections virales. Ces trois voies aboutissent le plus souvent à l'activation d'endoprotéases à cystéine appelées caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinases), responsables du clivage de nombreux substrats cellulaires.

La 2A^{pro} joue également un rôle important dans le contournement de la réponse antivirale en conférant au RVH la capacité de se répliquer dans des cellules traitées à l'interféron de type I (Morrison and Racaniello 2009). De plus, la protéine IPS-1 (interferon-bêta promoter stimulator 1), protéine interagissant avec MDA-5 et intervenant dans l'induction de la production d'interféron bêta, est clivée par les protéases 2A et 3C au cours de l'infection ce qui perturbe la production d'interféron de type I en réponse à l'infection.

1.4.8. Perturbation de l'homéostasie calcique

L'homéostasie calcique est perturbée dans les cellules infectées par le RVH. L'infection s'accompagne d'une augmentation de la concentration en calcium cytosolique probablement due à une augmentation de la concentration en IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate) et à l'activation de la phospholipase C (Guinea, Lopez-Rivas et al. 1989; Irurzun, Arroyo et al. 1995). De plus, la protéine 2B, en formant des pores dans les bicouches lipidiques du RE et du Golgi, pourrait aussi jouer un rôle dans cet influx de calcium (de Jong, de Mattia et al. 2008).

1.4.9. RVH et mort cellulaire

Il existe différents types de mort cellulaire dont la nécrose, l'autophagie et l'apoptose. Plusieurs études montrent que l'apoptose est induite dans les cellules infectées par les RVH-1B, -9 et -14 (Taimen, Berghall et al. 2004; Deszcz, Gaudernak et al. 2005). Cette apoptose dépendante des caspases 9 et 3 mais pas de la caspase 8, serait ainsi induite selon la voie intrinsèque ou voie mitochondriale et faciliterait la libération des virions néoformés (**Figure 13**). De manière intéressante, il a été démontré que l'expression des protéases virales 2A ou 3C est suffisante pour induire l'apoptose (Barco, Feduchi et al. 2000; Goldstaub, Gradi et al. 2000; Calandria, Irurzun et al. 2004). De la même manière, les protéases 2A et 3C codées par un autre membre du genre entérovirus, l'entérovirus 71, induisent l'apoptose (Kuo, Kung et al. 2002; Li, Hsu et al. 2002). Plusieurs membres du genre entérovirus tels que le poliovirus, le coxsackievirus et l'entérovirus 71 semblent détourner la voie de l'autophagie pour former les vésicules

nécessaires à la réplication du génome viral. Jackson et al. ont montré que les RVH-2 et -14 induisent la formation d'autophagosomes bien que ces résultats soient controversés (Klein and Jackson; Jackson, Giddings et al. 2005; Brabec-Zaruba, Berka et al. 2007).

1.5. Epidémiologie et pathologies associées aux rhinovirus

1.5.1. Epidémiologie et circulation

Le RVH est la première cause virale d'infection des voies respiratoires supérieures tant chez l'enfant que chez l'adulte (Makela, Puhakka et al. 1998). Son tropisme est donc essentiellement respiratoire alors que les autres membres du genre entérovirus sont responsables d'atteintes variées, notamment méningées, digestives ou respiratoires. Le taux d'infection est maximal dans la petite enfance et décroît avec l'âge, probablement en raison de l'immunité induite par l'exposition cumulée à différents sérotypes, mais aussi en raison d'une diminution de contacts rapprochés avec des personnes infectées (Wald, Shult et al. 1995).

Les RVH circulent sur l'ensemble de la planète et aucune distribution géographique particulière des différents sérotypes de ce virus n'est à ce jour documentée. Les infections à RVH sont observées toutes les années avec des pics au début de l'automne et du printemps dans l'hémisphère nord (Monto 2002; Savolainen, Mulders et al. 2002). Les RVH sont également les virus le plus fréquemment isolés en été mais leur incidence est faible (Monto 2002). Plusieurs études ont montré que 77 % des infections respiratoires du mois de septembre étaient dues aux seuls rhinovirus (Monto and Ullman 1974; Arruda, Pitkaranta et al. 1997). Pendant le mois d'octobre, l'incidence globale des infections respiratoires augmente toujours avec une majorité de RVH pour laisser place durant l'hiver aux infections à virus para-influenza puis à virus influenza et à virus respiratoire syncytial (VRS). L'incidence des rhinovirus augmente à nouveau au début du printemps pour diminuer ensuite pendant l'été (Monto 2002).

Les premières informations dans la compréhension de la transmission du RVH dérivent d'études dans lesquelles des adultes volontaires sains ont été infectés

expérimentalement par le RVH (Turner, Winther et al. 1984; Pitkaranta and Hayden 1998). Ces résultats suggèrent que la transmission du RVH s'effectue par des particules d'aérosols ou par contact direct (Gwaltney and Hendley 1978; Gwaltney, Moskalski et al. 1978; Hendley and Gwaltney 1988; Anzueto and Niederman 2003). Ainsi, les gestes basiques de tous les jours des personnes infectées peuvent représenter une source de transmission. En particulier, la contamination des mains et les surfaces touchées par ces individus (interrupteur, touches de téléphone,...) constituent des vecteurs importants de transmission (Winther, McCue et al. 2007).

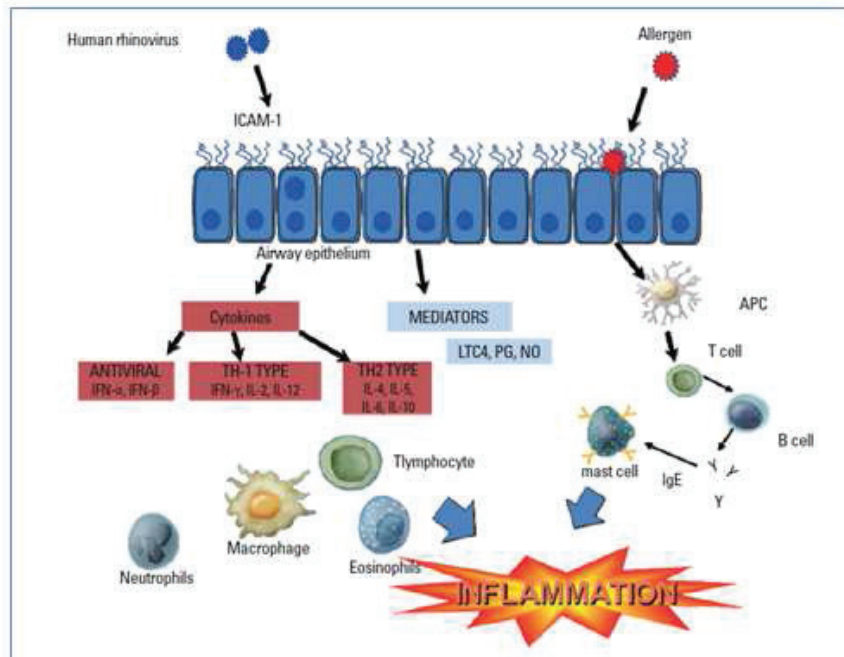
1.5.2. Physiopathologie et réponse immune

Le rhinovirus est le principal agent responsable du rhume. Au cours d'une infection, le virus est déposé sur les muqueuses nasales ou conjonctivales et est transporté jusqu'au nasopharynx postérieur par les cellules épithéliales ciliées. Dans le nasopharynx, le virus s'attache aux cellules épithéliales *via* les récepteurs ICAM-1 pour les RVH du groupe majeur ou LDL pour les RVH du groupe mineur. L'analyse de biopsies d'épithélium nasal par immunofluorescence ou hybridation *in situ* montre que l'infection se limite à un petit nombre de cellules et ne modifie que très peu la morphologie et l'intégrité de l'épithélium nasal (Turner, Winther et al. 1984; Arruda, Boyle et al. 1995; Pitkaranta and Hayden 1998). Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les symptômes du rhume sont le reflet d'une réponse inflammatoire plutôt que d'un effet lytique des cellules infectées (Naclerio, Proud et al. 1988; Pitkaranta and Hayden 1998; Turner, Weingand et al. 1998). Papadopoulos et al (2000) ont apporté la preuve que le RVH peut avoir des effets lytiques sur les cellules épithéliales bronchiales en culture ainsi que sur celles d'individus infectés expérimentalement (Papadopoulos and Johnston 2000). Quelques études corrélient l'infection à RVH à la concentration en IL-1, IL-6 et IL-8 dans les sécrétions nasales (Turner, Weingand et al. 1998; Papadopoulos, Bates et al. 2000). Ces médiateurs sont responsables d'une réaction inflammatoire entraînant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire responsables de la rhinorrhée, de l'obstruction nasale caractéristique du rhume, ainsi que du recrutement de leucocytes au niveau de l'épithélium respiratoire amplifiant l'inflammation (**Figure 14A**).

La phase immune innée est médiée en partie par les interférons de type I. En effet, les RVH sont reconnus par plusieurs récepteurs de l'immunité innée tels que les TLR-7 et TLR-8 (Toll Like Receptor) qui sont exprimés au niveau des endosomes et qui se lient aux molécules d'ARN simple brin. Ces récepteurs activent plusieurs voies de signalisation intracellulaire dont celles qui dépendent de MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene-88), de TRAF-6 (TNF Receptor Associated Factor 6), d'IRAK-1 et -4 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase) et d'IRF-7 (Interferon Regulatory Factor) (Nurani, Lindqvist et al. 2003; Lau, Wang et al. 2008). Au cours de la réplication du génome viral, les molécules d'ARN double-brins sont reconnues par les TLR-3, localisés au niveau des endosomes ce qui active les cascades de signalisation dépendantes de TRIF (TIR-containing adaptator inducing interferon- β), IKK γ , β et α et NF- κ B. Dans le cytoplasme, les hélicases RIG-1 et MDA-5 se lient à l'ARN viral et activent une cascade similaire. L'activation de ces voies de signalisation conduit à la production d'interférons ayant des propriétés antivirales (**Figure 14B**).

La phase adaptative est caractérisée par la production d'anticorps spécifiques à un sérotype donné. Des taux détectables d'anticorps anti-RVH apparaissent en général dans le sang une à deux semaines après l'inoculation avec un taux maximal atteint après 5 semaines. Une réponse spécifique des cellules T CD4⁺ peut être activée par plusieurs sérotypes indiquant la présence d'épitopes communs (Gern, Dick et al. 1997). Ainsi des cellules T CD4⁺ mémoire pourraient être activées en réponse à une infection. Ce phénomène semble être plus limité pour l'immunité humorale.

A)



B)

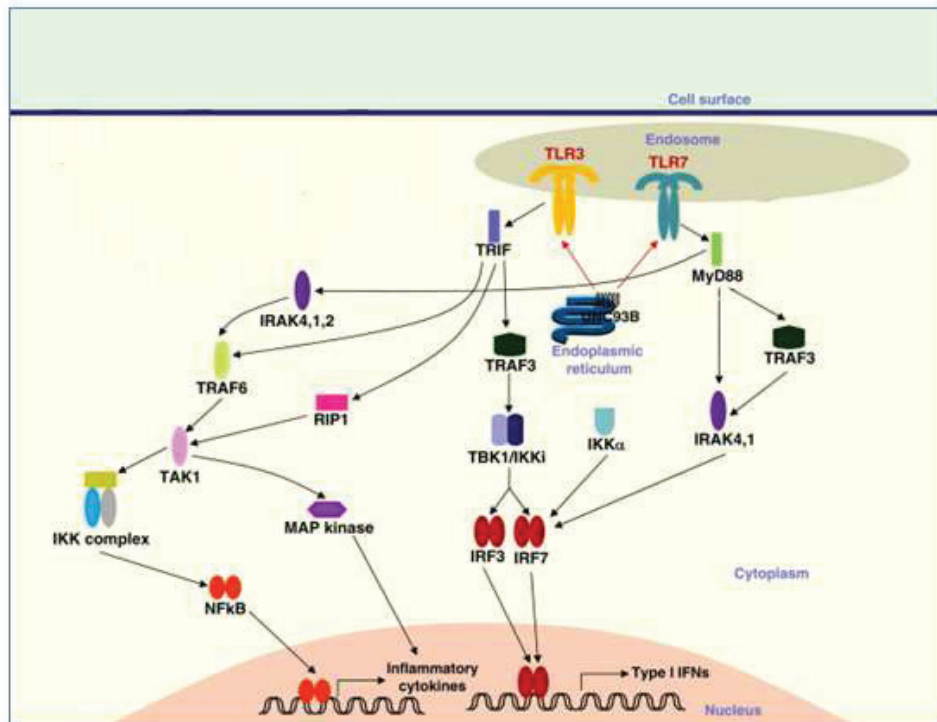


Figure 14. Schéma de l'induction de la réponse inflammatoire par le rhinovirus humain.

(A) L'infection des cellules épithéliales des voies respiratoires induit l'expression et la sécrétion de diverses cytokines conduisant au recrutement des neutrophiles et éosinophiles et à l'activation de la réponse inflammatoire. Une réponse antivirale est également mise en place par les cellules épithéliales et dendritiques qui secrètent les interférons de type I. La présence d'allergènes au cours des infections à RVH peut perturber la réponse antivirale et être associée à des pathologies plus sévères. IL interleukin, LTC4 leukotriène C4, PG : prostaglandins, NO nitric oxide. (D'après Kim et *al.*, 2012)

(B) Voies de signalisation induites par les TLR3 et 7. TLR3 et TLR7 sont localisés au niveau des endosomes où ils reconnaissent respectivement les molécules d'ARN double-brins et simple-brin. TLR3 active des voies de signalisation dépendantes de TRIF alors que TLR7 active des cascades dépendantes de MyD88. Tous les deux induisent l'expression des cytokines inflammatoires et d'interférons de type I. (Adapté de Kumar et *al.*, 2009)

1.5.3. Pathologies associées aux RVH

1.5.3.1. Le Rhume

Le rhinovirus est responsable classiquement du rhume. L'infection se traduit par un écoulement nasal en alternance avec une obstruction nasale et de possibles maux de gorge. D'autres symptômes comme des toux et de la fièvre (10 à 20 % des cas) peuvent également y être associés. La période d'incubation du RVH varie de 1 à 4 jours. Le virus est détectable dans les sécrétions nasales en moyenne 10 heures post-infection et la quantité de virus produite augmente jusqu'à un pic de concentration en 2 ou 3 jours, ce qui se traduit par des symptômes maximums (Douglas, Cate et al. 1966; Harris and Gwaltney 1996; Gwaltney 2002). Le rhume dure en moyenne une semaine mais le rhinovirus peut être détecté dans les sécrétions nasales durant une période de deux à trois semaines, même en l'absence de symptômes.

1.5.3.2. Rhinosinusites et Otites

Le rhinovirus n'infecte pas exclusivement la cavité nasale et le pharynx mais les sinus para-nasaux peuvent également être atteints puisqu'il peut être détecté dans des aspirations de sinus (Gwaltney, Phillips et al. 1994). La technique d'hybridation *in situ* a permis de détecter la présence d'ARN viral dans les cellules épithéliales des muqueuses démontrant ainsi l'implication directe du rhinovirus dans plusieurs cas de sinusites (Heikkinen and Jarvinen 2003). L'infection à RVH peut également conduire à une otite moyenne aiguë secondaire chez l'enfant (Pitkaranta, Jero et al. 1998; Heikkinen and Jarvinen 2003; Chantzi, Papadopoulos et al. 2006).

1.5.3.3. Rhinovirus et infection des voies aériennes inférieures

Les rhinovirus ont longtemps été considérés comme incapables d'infecter les voies aériennes inférieures du fait que leur température optimale de réplication est de 33°C (Stott and Heath 1970). Cependant, la température plus élevée des voies respiratoires inférieures ne constitue pas un frein à la réplication de ce virus qui se multiplie aussi bien sinon mieux dans les cultures primaires de cellules épithéliales des voies respiratoires inférieures que dans les cellules des voies respiratoires supérieures

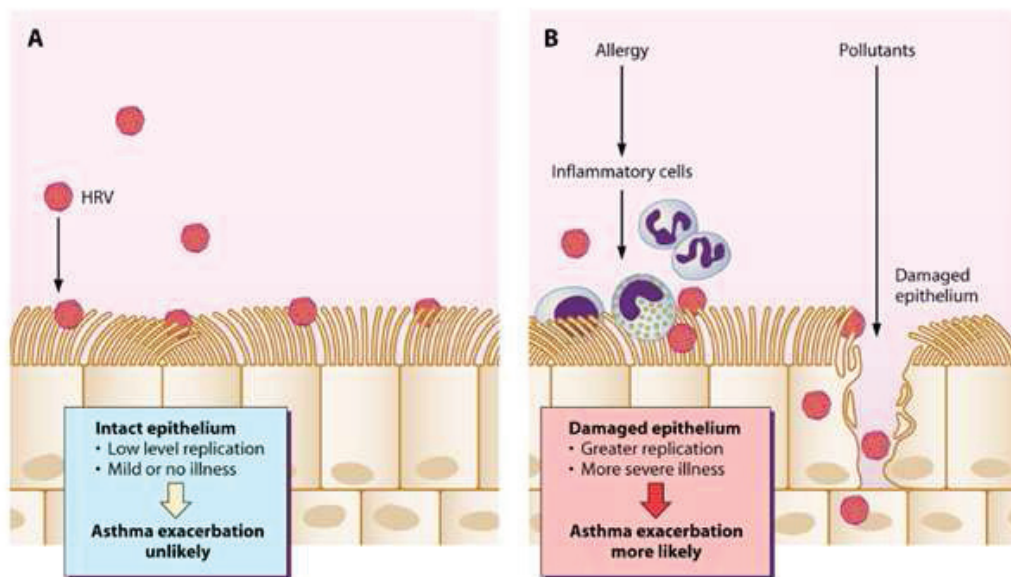


Figure 15. Effets de l'intégrité de l'épithélium respiratoire sur la sévérité des infections à RVH et l'exacerbation d'asthme.

(A) Un épithélium respiratoire intact est peu sensible aux infections à RVH. En cas d'infection, le taux de réplication du virus est le plus souvent faible.

(B) Un épithélium endommagé est plus sensible aux infections par le RVH. Chez les patients asthmatiques, ceci se manifeste par une exacerbation de l'asthme.

(D'après Gern et *al.* 2010)

(Papadopoulos, Sanderson et al. 1999; Papadopoulos, Bates et al. 2000; Papadopoulos and Johnston 2000; Mosser, Brockman-Schneider et al. 2002). Plusieurs observations cliniques confortent également cette idée puisque la présence d'ARN viral ainsi qu'une réplication active du virus ont été révélées par hybridation *in situ* dans 50 % des biopsies bronchiques de sujets sains ou asthmatiques infectés expérimentalement (Cate, Couch et al. 1965; Craighead, Meier et al. 1969; Papadopoulos, Bates et al. 2000; Seipelt, Liebig et al. 2000; Kaiser, Aubert et al. 2006; Malmstrom, Pitkaranta et al. 2006). Durant des infections « naturelles », le RVH a aussi été détecté dans des biopsies de bronches d'enfants présentant des pathologies respiratoires récurrentes (Malmstrom, Pitkaranta et al. 2006).

De plus, plusieurs données cliniques supportent une implication du RVH dans la genèse de complications respiratoires chez les patients fortement immunosupprimés, patients chez lesquels l'infection par le rhinovirus est la plus fréquente des infections respiratoires et peut persister pendant plusieurs mois (Garbino, Gerbase et al. 2004; Kaiser, Aubert et al. 2006).

1.5.3.4. Asthme

Les rhinovirus peuvent également jouer un rôle essentiel dans les exacerbations d'asthme (Johnston, Pattemore et al. 1995; Gern and Busse 1999). En particulier, une étude réalisée sur des enfants scolarisés a rapporté que sur 292 épisodes associant une infection respiratoire et des signes cliniques d'asthme, 50 % environ étaient liés à la présence de picornavirus (Johnston, Pattemore et al. 1995). La même étude réalisée chez des adultes a montré que le rhinovirus était présent dans près de 30 % des épisodes associant infection respiratoire et asthme (Nicholson, Kent et al. 1993). Dans tous ces cas, la production insuffisante d'IFNs de type I dans les cellules bronchiques des patients asthmatiques favorisait la réplication virale et entraînait par voie de conséquence une réponse inflammatoire importante qui pouvait expliquer l'exacerbation d'asthme (Wark, Johnston et al. 2005) (**Figure 15**). De plus, les infections à RVH chez les bébés de moins de 2 ans favoriseraient l'apparition d'asthme pendant l'enfance (Kusel, de Klerk et al. 2007; Jackson, Gangnon et al. 2008; Gern 2010).

Enfin, il est maintenant bien établi que les RVH du groupe C sont le plus souvent associés à l'exacerbation d'asthme viro-induite (Miller, Edwards et al. 2009).

1.5.3.5. Complications associées aux infections par le rhinovirus

Comme pour beaucoup d'infections virales, le risque principal de complications demeure la surinfection bactérienne. Dans le cas du RVH, elle peut être responsable de sinusites ou d'otites moyennes aiguës. Il a ainsi été montré que chez des enfants infectés par le RVH, 25,6 % d'entre eux avaient une infection ORL, 25,6 % une infection bronchique (bronchite ou bronchiolite), 6,2 % une pneumopathie et 5,7 % une crise d'asthme (Guittet, Brouard et al. 2003).

Plusieurs événements associés aux infections à RVH pourraient expliquer ces surinfections. Il a notamment été démontré que les infections à RVH entraînent une augmentation de la quantité de récepteurs PAFR (platelet-activating factor receptors) exprimés à la surface des cellules épithéliales de la trachée et une augmentation du niveau d'expression de PAFR et de fibronectine dans les cellules épithéliales nasales favorisant ainsi l'adhésion du *Streptococcus pneumoniae* (Ishizuka, Yamaya et al. 2003; Wang, Kwon et al. 2009). Le RVH faciliterait également l'internalisation et la transmigration du *Staphylococcus aureus* via la dissociation de ZO-1 (zona occludens 1) au niveau des jonctions serrées (Passariello, Schippa et al. 2006). Enfin, le rhinovirus diminue la sécrétion de TNF- α et IL-8 en réponse à une exposition à des produits bactériens dans les macrophages alvéolaires humains (Oliver, Lim et al. 2008).

1.5.4. Modèles d'étude

Le RVH peut infecter divers types cellulaires humains exprimant les récepteurs LDL et/ou ICAM-1. Ceux-ci incluent notamment les cellules rénales embryonnaires, les fibroblastes adultes, les cellules de l'épithélium respiratoire et les lignées A549, Hep-2, WI-38 et HeLa.

Certains laboratoires ont tenté de mettre au point des modèles animaux des infections à RVH. Ainsi, des chimpanzés ont notamment été infectés par plusieurs sérotypes du RVH pour évaluer l'efficacité d'un antiviral ciblant ce virus (Huguenel, Cohn et al.

1997; Turner 2007). Le rhinovirus n'infecte ni les lapins, ni les cochons d'inde et les RVH du groupe majeur ne reconnaissent pas les ICAM-1 murins. En 1986, Yin et Lomax ont mis au point un premier modèle murin en utilisant le serotype RVH-2 du groupe mineur adapté sur culture de fibroblastes (Yin and Lomax 1986). Par la suite, Newcomb et al (2008) ont démontré que le RVH-1B (un autre membre du groupe mineur) se réplique et induit une réponse inflammatoire *in vivo* chez des souris femelles C57BL/6 âgées de 6 à 8 semaines (Newcomb, Sajjan et al. 2008). Au même moment, Bartlett et al (2008) ont établi trois modèles murins d'infections par le RVH chez des souris BALB/c. Dans le premier modèle, des souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines ont été infectées par le RVH-1B. Dans le second modèle, des souris BALB/c transgéniques exprimant une chimère d'ICAM-1 murin/humain ont été infectées par le RVH-16, membre du groupe majeur. Enfin, le dernier modèle reproduisait l'exacerbation d'asthme induite par le RVH (Bartlett, Walton et al. 2008).

Ainsi, jusqu'en 2008, l'absence de modèle animal réellement efficace pour tester en particulier les effets de molécules antivirales sur les infections à rhinovirus a conduit les chercheurs à faire appel à des volontaires humains sains infectés de manière expérimentale par divers sérotypes du RVH (RVH-4, -9, -23, -29 et -39) (Hayden and Gwaltney 1982; Levandowski, Pachucki et al. 1982; Hayden and Gwaltney 1983; Phillpotts, Wallace et al. 1983; Hayden, Deforest et al. 1984; Turner, Dutko et al. 1993; Turner, Riker et al. 2000).

1.6. Stratégies antivirales contre le RVH

1.6.1. Enjeux et contraintes de la découverte d'un traitement

Le RVH qui est la première cause d'infections des voies respiratoires supérieures et inférieures constitue un véritable problème de santé publique dans bon nombre de pays industrialisés (Anzueto and Niederman 2003). En termes de coût, les dépenses pour soigner le rhume dépassent les 4 milliards de dollars par an aux Etats-Unis, avec plus de 1 milliard pour la prescription inappropriée d'antibiotiques (Fendrick, Monto et al. 2003). Avec une pointe d'ironie, White et Fenner (1994) résume cette situation de la manière suivante : « In this era of organ transplantation, genetic engineering, and other

dramatic demonstrations of the wonders of medical science, the man in the street perceives a certain irony in the inability of modern medicine to make the slightest impact on that most trivial of all human ailments, the common cold » (White 1994).

Du fait de la grande variabilité antigénique présentée par la centaine de sérotypes de RVH, l'élaboration d'un vaccin dirigé contre le rhinovirus est confrontée à plusieurs difficultés techniques. Si la mise au point d'un antiviral semble être ainsi une meilleure piste pour lutter contre les rhinovirus, l'approche thérapeutique fait elle aussi face à plusieurs contraintes : (i) l'antiviral doit atteindre le tractus respiratoire en priorité (des antiviraux distribués soit par spray nasal ou poudre à inhaler sont des stratégies envisageables), (ii) le traitement doit également être d'une efficacité rapide car la durée de la maladie est courte, (iii) il devra prévenir les complications liées aux infections à rhinovirus, et (iv) il devra être efficace contre l'ensemble des sérotypes.

La longue quête vers un antiviral a débuté il y a une quinzaine d'années avec l'utilisation d'interféron par voie intranasale. Par la suite, plusieurs inhibiteurs de l'attachement de la particule virale à son récepteur cellulaire ont été mis au point. D'autres stratégies ont ciblé les protéases virales 2A et 3C. Enfin, l'utilisation d'ARN interférant est également envisagée (**Tableau 5**).

1.6.2. L'utilisation d'interférons pour lutter contre le RVH

Les interférons sont au centre des réponses antivirales et leur utilisation à des fins thérapeutiques peut être envisagée. Les interférons ont pour avantages de présenter un large spectre d'actions ainsi qu'un faible risque de développement de résistance. Plusieurs études ont décrit l'injection d'interférons par voie intranasale chez des volontaires infectés expérimentalement ou chez des patients infectés naturellement par le RVH (Hayden, Albrecht et al. 1986; Sperber and Hayden 1988; Sperber, Levine et al. 1989; Rotbart 2002). Dans ces études, l'injection intranasale et prophylactique d'interféron alpha 2b et bêta a montré des résultats encourageants avec notamment une diminution de la durée de la maladie. En revanche, ce type de traitement n'a eu que peu ou pas d'effets quand il a été administré après infection (Hayden and Gwaltney 1984; Monto, Schwartz et al. 1989). Des effets secondaires tels que des saignements de la muqueuse nasale ont également été détectés (Samo, Greenberg et al. 1983; Farr, Gwaltney et al. 1990).

Cible de l'antiviral	Nom de la molécule antivirale	Compagnie pharmaceutique	IC ₅₀ (µM) (tests <i>in vitro</i>)	Nombre de sérotypes testés	Etat des essais cliniques
Capside	Disoxaril	-	0,01-18,1	35	Arrêté
	Pleconaril	Sterling Winthrop/Viropharma	0,03-17,5	Tous	Demande auprès de la FDA rejetée en 2002
		Schering-Plough (2003)			Phase II en cours pour les infections à entérovirus chez les nouveau-nés
	Pirodavir BTA-798	Janssen Research Foundation Biota Holdings Ltd	0,003-39,0 -	Tous -	Arrêté Phase IIa validée
Protéase 3C	Rupintrivir	Agouron/Pfizer Inc	0,003-0,08	48	Arrêté en phase II
	Compound 1	Agouron/Pfizer Inc	0,014-0,12	35	Arrêté en phase I
Réplication de l'ARN viral	Enviroxime	Lilly Research Laboratories	0,03-1	12	Arrêté en phase II

Tableau 5. Tableau récapitulatif des principales molécules chimiques antivirales testées contre le RVH et évaluées au cours d'essais cliniques.

Sources : Rollinger et *al.* 2009, Thibault et *al.* 2012

1.6.3. Inhibiteurs de l'attachement, de l'entrée et du « déshabillage » du virus

L'inhibition de l'attachement du virus et/ou de la décapsidation du RVH constitue une alternative particulièrement intéressante pour bloquer les premières étapes du cycle de réplication virale. Le virus peut être neutralisé par l'utilisation (i) d'anticorps spécifiques dirigés contre la particule virale, (ii) d'anticorps dirigés contre les récepteurs cellulaires ICAM-1 ou LDLR, (iii) de molécules de récepteurs solubles qui inhibent de manière compétitive l'attachement de la particule virale à son récepteur cellulaire et (iv) de composés interagissant avec la capsid virale. En raison du nombre élevé de sérotypes circulants, l'utilisation d'anticorps spécifiques du RVH pour lutter contre les infections à rhinovirus n'est que très peu probable. En revanche, l'utilisation de molécules de récepteurs solubles ou d'anticorps ciblant les récepteurs cellulaires des RVH des groupes majeur et mineur permettrait d'inhiber l'ensemble des sérotypes.

1.6.3.1. Utilisation d'anticorps ciblant les récepteurs cellulaires ICAM-1 et LDLR

Plusieurs études ont démontré *in vitro* l'efficacité de l'utilisation d'anticorps dirigés contre les récepteurs ICAM et LDLR pour lutter contre le RVH (Colonno, Callahan et al. 1986; Hodits, Nimpf et al. 1995). En particulier, l'efficacité d'un anticorps murin dirigé contre ICAM-1 a été évaluée dans deux essais cliniques en double-aveugle, randomisés et sous contrôle d'un placebo. Dans cet essai, les volontaires ont été traités avec l'anticorps ou le placebo puis inoculés avec le RVH-39 (Hayden, Gwaltney et al. 1988). Aucune toxicité liée à l'anticorps n'a été détectée. La plus forte dose d'anticorps (1 mg / sujet) n'a pas réduit l'infection globale ou les taux de morbidité mais a retardé de 1 à 2 jours l'apparition des premiers symptômes du rhume. Le titre viral n'a diminué significativement que 48 h post-infection démontrant le manque d'efficacité de cette approche thérapeutique.

Une autre stratégie a consisté à utiliser des anticorps multivalents dirigés contre ICAM-1. Une nouvelle molécule, nommée **CFY196**, présentait ainsi une meilleure activité *in vitro* contre le RVH comparée aux anticorps monoclonaux classiques (Fang and Yu

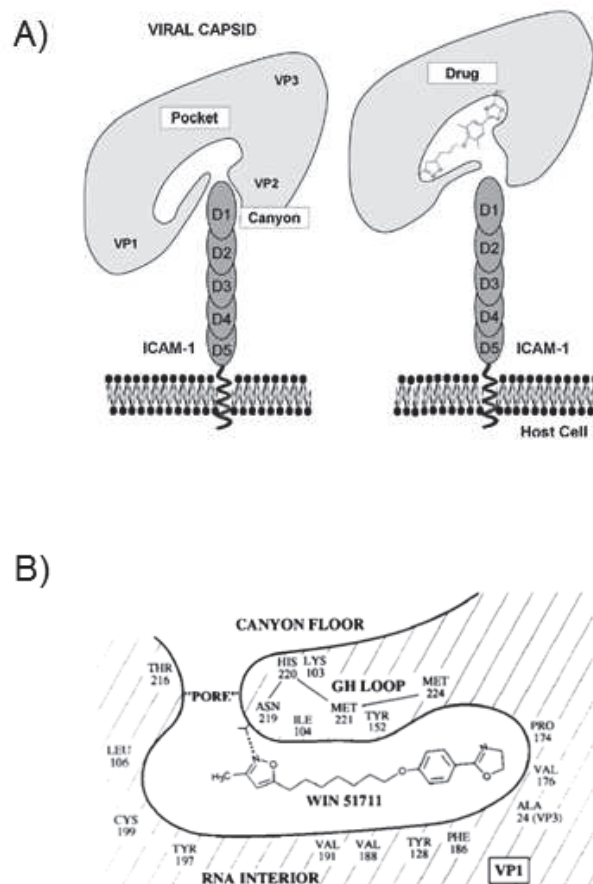


Figure 16. Mode d'action des molécules inhibitrices du RVH se fixant à la capside.

(A) Schéma représentatif du mode d'action des molécules inhibitrices se fixant à la capside des rhinovirus du groupe majeur. A gauche : Le récepteur ICAM-1 se fixe à la capside au niveau du canyon. A droite : la fixation d'un inhibiteur au niveau de la poche hydrophobe localisée sous le canyon entraîne un changement de conformation et empêche l'interaction avec le récepteur cellulaire (d'après Thibault et *al.* 2012).

(B) Représentation schématique de la fixation du composé WIN51711 dans la poche hydrophobe du RVH-14. (d'après Rossmann et *al.* 1994)

2004). CFY196, sous le nom commercial de ColdSol, est en cours de développement sous forme de spray nasal.

1.6.3.2. Utilisation de formes solubles de ICAM-1 et LDLR

Des formes solubles de ICAM-1 entier ou tronqué et de concatémères de LDLR ont été utilisés *in vitro* pour inhiber les RVH des groupes majeur et mineur (Marlin, Staunton et al. 1990; Crump, Arruda et al. 1994; Ohlin, Hoover-Litty et al. 1994; Marlovits, Abrahamsberg et al. 1998; Marlovits, Zechmeister et al. 1998; Moser, Snyers et al. 2005; Nicodemou, Petsch et al. 2005). L'activité antivirale d'une forme tronquée d'ICAM-1 a été prouvée *in vivo* chez le chimpanzé infecté par le RVH-16 (Huguenel, Cohn et al. 1997). Le **tremacamra**, forme soluble de ICAM-1 mise au point par Boehringer Ingelheim a également été évalué dans quatre essais en double aveugle dans lesquels des sujets ont reçu le tremacamra sous forme de spray nasal ou de poudre à inhaler 7 h avant ou 12 h après inoculation du RVH-39 puis 6 fois par jour pendant 7 jours (Turner, Wecker et al. 1999). Le tremacamra s'est avéré capable de réduire la « sévérité » des rhumes expérimentaux qu'il soit administré avant ou après infection. En revanche, cette molécule semblait moins efficace lorsqu'elle était administrée plus de 12 h après infection. Aucune autre étude concernant l'effet de cette molécule sur l'infection n'a été décrite depuis lors.

1.6.3.3. Utilisation de molécules se fixant à la capsid

En se fixant dans la poche hydrophobe située sous le canyon formé par les protéines VP1, certaines molécules provoquent un changement conformationnel de la capsid et empêchent ainsi l'attachement et/ou la décapsidation du virus (Rossmann 1989; Shih, Chen et al. 2004) (**Figure 16A**).

Parmi celles-ci, les composés «WIN», développés par Sterling Winthrop, ont été découverts par hasard au cours d'un projet de synthèse de molécules mimant les hormones juvéniles (Diana, Salvador et al. 1977; Diana, Salvador et al. 1977). Le premier composé de la série « WIN », **l'arildone ou WIN38020 (Figure 17)**, inhibait la réplication du poliovirus *in vitro* et *in vivo* chez la souris (McSharry, Caliguiri et al. 1979; Caliguiri, McSharry et al. 1980; McKinlay, Miralles et al. 1982).

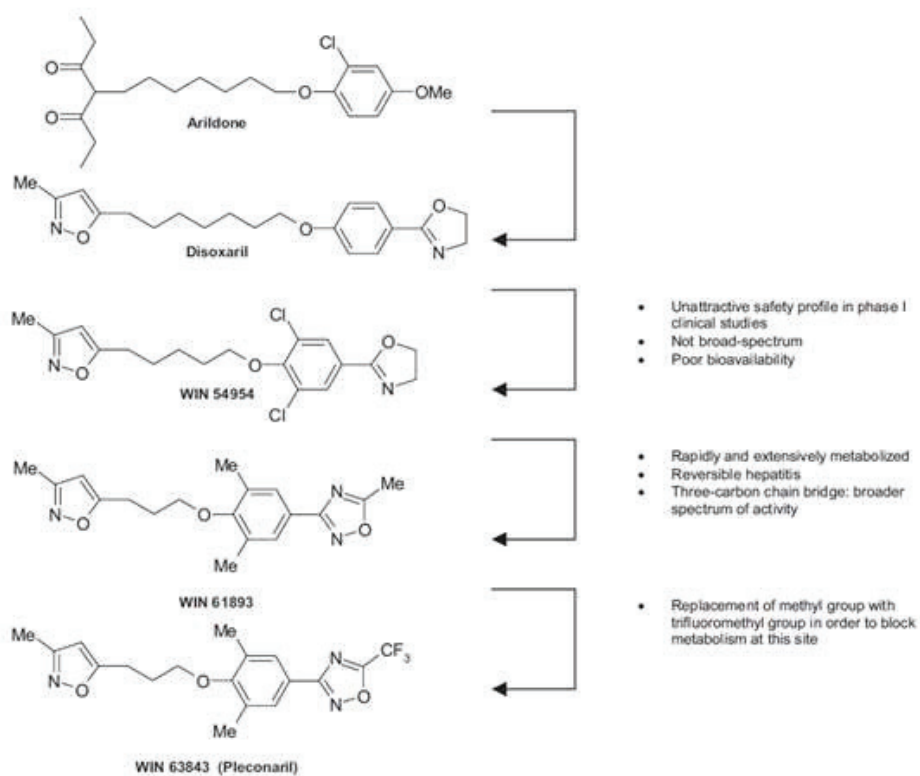


Figure 17. Evolution des composés WIN. (adapté de De palma et *al.* 2008)

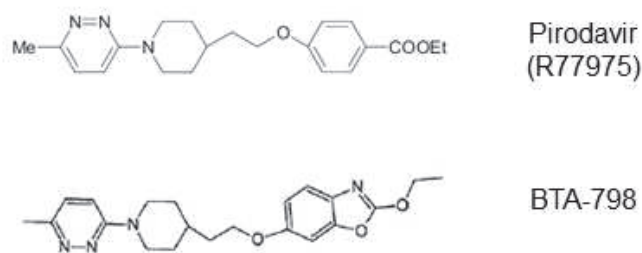


Figure 18. Formule du Pirodavir et du BTA-798

L'arildone a subi plusieurs modifications chimiques au cours de son développement pour augmenter à la fois son pouvoir inhibiteur et sa stabilité (Diana, McKinlay et al. 1985; Diana, Otto et al. 1985; McKinlay 1985). Un dérivé de l'arildone, le **disoxaril ou WIN51711 (Figure 16B)** s'est avéré actif *in vitro* contre une partie seulement des RVH et son efficacité a également été évaluée au cours d'essais cliniques pendant lesquels les sujets traités avec de fortes doses ont développé des calculs rénaux (Otto, Fox et al. 1985). Le composé **WIN54954**, qui s'est avéré plus efficace et plus biodisponible, a été testé chez l'homme en 1992. Cependant, cette molécule a été abandonnée par la suite du fait qu'elle était trop rapidement catabolisée et pouvait provoquer des hépatites.

De plus, elle s'est révélée totalement inefficace chez des sujets inoculés par différentes souches du RVH telles que le RVH-23 et le RVH-29 (Turner, Dutko et al. 1993). La série des composés WIN s'est achevée avec la découverte du **WIN 63843 ou pleconaril**. Ce composé, qui présente un temps de demi-vie plus long que ses prédécesseurs, inhibe la réplication de la plupart des sérotypes du RVH (Diana, Rudewicz et al. 1995; Pevear, Tull et al. 1999; Kaiser, Crump et al. 2000; Ledford, Patel et al. 2004; Schmidtke, Hammerschmidt et al. 2005). Ce composé, administré par voie orale à 33 volontaires, à raison de 200 mg deux fois par jour pendant 7 jours, a montré une réduction significative de la production de mucus nasal et des symptômes respiratoires chez tous les sujets traités (Schiff and Sherwood 2000). Le pleconaril a été évalué par la suite dans deux essais de phases II de rhumes « naturels » impliquant 1024 individus en bonne santé qui ont présenté des symptômes respiratoires durant les mois de juillet à décembre (Hayden, Coats et al. 2002). Le composé a été associé à une réduction de la durée des symptômes de 1 à 1,5 jours. De manière générale, il était bien toléré mais pouvait entraîner des effets indésirables comme des désordres gastro-intestinaux ou l'activation du cytochrome hépatique P450 3A. De plus, une résistance à l'antiviral a été détectée chez 24 % des patients traités. C'est pourquoi en 2002, la FDA a refusé l'administration par voie orale de pleconaril pour le traitement du rhume. Pour diminuer les effets secondaires du pleconaril, Shering-Plough, sous la licence de ViroPharma a effectué en 2007 un essai de phase II avec une formulation intranasale du pleconaril. Les résultats de cette étude n'ont pas été publiés.

Alors que le développement des composés WIN avait dû faire face aux difficultés citées précédemment, une autre liste de molécules visant à enrayer elles aussi les infections à

RVH était publiée à peu près à la même époque par la Janssen Research Foundation. Parmi elles, le **Pirodavir (R77975, Figure 18)** qui semblait représenter un antiviral efficace *in vitro* contre un large éventail de RVH s'est révélé sans effet *in vivo* pour soigner des patients enrhumés du fait de l'hydrolyse rapide du groupement éther présent dans la molécule (Andries, Dewindt et al. 1992; Hayden, Andries et al. 1992). La société Biota a contourné ce problème en développant des analogues du pirodavir possédant un groupement oxime éther (Barnard, Hubbard et al. 2004). Parmi ces composés, le **BTA-798** était 10 fois plus efficace que le pleconaril *in vitro* et présentait une demi-vie plus longue et une meilleure biodisponibilité orale (Brown, Cameron et al. 2005). Il fait l'objet d'une étude clinique de phase II lancée en 2008 dont les premiers résultats sont encourageants (www.biota.com.au).

La plupart sinon la totalité des agents de liaison à la capside virale décrits ci-dessus ont été associés à la sélection de sérotypes résistants qui s'explique par la variabilité et la plasticité importantes de la protéine VP1 (De Palma, Vliegen et al. 2008). Pour éviter cette émergence, il semble intéressant d'utiliser une combinaison de deux molécules avec des cibles virales différentes (Thibaut, Leyssen et al.).

1.6.4. Inhibiteurs des protéases virales 2A et 3C

Les protéases virales 2A et 3C constituent des cibles particulièrement attrayantes pour développer de nouveaux antiviraux pour les raisons suivantes : (i) elles jouent un rôle essentiel dans la maturation de la polyprotéine virale et la perturbation de plusieurs voies cellulaires, (ii) leurs résidus catalytiques sont largement conservés au sein des entérovirus et elles présentent une faible homologie de séquences avec les protéases cellulaires et enfin (iii) l'inhibition de l'activité des protéases virales s'est avérée une stratégie particulièrement efficace dans le traitement de nombreuses infections notamment celles à VIH et à HCV (Hépatite C Virus).

Les inhibiteurs d'enzymes protéolytiques peuvent être classés en deux groupes distincts: les inhibiteurs peptidiques synthétisés sur la base des spécificités de clivage de l'enzyme, et les inhibiteurs non peptidiques. Ces composés piègent l'enzyme cible de manière réversible ou irréversible. Seuls les principaux inhibiteurs connus de la protéase

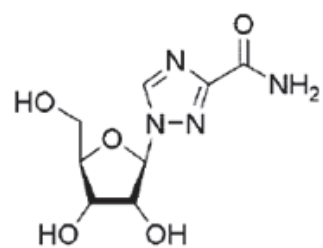
3C seront décrits ci-après. Les inhibiteurs spécifiques de la protéase 2A seront détaillés plus loin dans cet exposé.

1.6.4.1. Inhibiteurs peptidiques de la protéase 3C

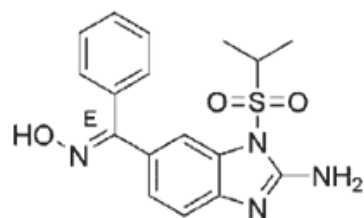
Les premiers inhibiteurs peptidiques de la 3C^{pro} ont été synthétisés sur la base de la séquence en amino acides de plusieurs sites naturels de clivage de la protéase. La détermination de la structure 3D de la protéase 3C a ensuite permis de modifier et d'optimiser ces inhibiteurs peptidiques.

La première série d'inhibiteurs peptidiques de la protéase 3C mis au point étaient des tétrapeptides contenant une séquence du type P1-Gln-Gly-P1' (d'après la nomenclature de Schechter and Berger) avec un groupement aldéhyde greffé sur la Gln (Schechter and Berger 1968). Bien que thermodynamiquement très stables, ces composés inhibaient avec assez peu d'efficacité l'activité de la 3C^{pro} et la réplication du RVH-14 *in vitro* (Cordingley, Callahan et al. 1990). Des dipeptides aldéhyde contenant une méthionine sulfone en P1, des tripeptides aldéhydes contenant un groupement cétone ainsi que des tétrapeptides aldéhyde avec une Gln diméthylamide en P1 ont été mis au point par la suite mais aucun d'entre eux n'a fait l'objet d'études cliniques (Malcolm, Lowe et al. 1995; Webber, Okano et al. 1998; Dragovich, Zhou et al. 2000).

S'appuyant sur la structure 3D connue de la protéase 3C, la société Pfizer (ex- groupe Agouron) a mis au point par modélisation moléculaire *in silico*, des peptides inhibiteurs de la protéase virale (Matthews, Dragovich et al. 1999). Ces composés étaient spécifiques puisqu'ils inhibaient l'activité de la 3C^{pro} mais pas celle des sérine et cystéine protéases cellulaires. Ainsi, le **rupintrivir (ou AG7088)** qui était efficace contre les enterovirus en général, s'est montré également efficace contre un large spectre de RVH avec une EC50 de 20 nM environ et a été choisi pour des études cliniques (Patick, Binford et al. 1999; Binford, Maldonado et al. 2005). Kaiser et al ont montré que le rupintrivir était actif contre 48 sérotypes différents de RVH avec une EC50 de 23 nM (Kaiser, Crump et al. 2000). En raison d'une faible biodisponibilité orale, le rupintrivir a été administré de préférence par voie intranasale (Zhang, Hee et al. 2001). Chez des volontaires sains inoculés avec du RVH, il a permis de réduire la charge virale et la sévérité des symptômes. Cependant, il n'a eu que peu d'effets chez



Ribavirine



Enviroxime

Figure 19. Formule chimique de la ribavirine et de l'enviroxime

des patients infectés naturellement (Hayden, Turner et al. 2003; Binford, Maldonado et al. 2005).

Plusieurs autres dérivés peptidiques inhibiteurs de la protéase 3C ont également été décrits. (Xian, Wang et al. 2000; Murray, Janc et al. 2001; Chen, Lamar et al. 2003).

1.6.4.2. Inhibiteurs non peptidiques de la protéase 3C

Plusieurs molécules chimiques ont été synthétisées pour mimer les liaisons formées entre les inhibiteurs peptidiques et la 3C^{pro}. Parmi elles, le **Compound 1** a été testé dans des études cliniques de phase I qui ont montré qu'il était sans effets secondaires notables (Dragovich, Prins et al. 2003; Binford, Maldonado et al. 2005; Patick 2006).

D'autres molécules comme les homophthalimides, les pseudoxazolones, le naphthoquinonelactol, la radicinine ont été décrites mais n'ont pas abouti à la mise au point d'un traitement efficace (Kadam, Poddig et al. 1994; Lall, Ramtohl et al. 2002; Ramtohl, James et al. 2002).

1.6.5. Inhibiteurs de la machinerie de réplication

Plusieurs molécules antivirales ont été étudiées pour leur capacité à cibler l'ARN génomique du rhinovirus. En particulier, les deoxyribozymes, les morpholino oligomères et les ARN interférants ciblent de manière séquence-spécifique l'ARN viral (Phipps, Martinez et al. 2004; Schubert, Furste et al. 2004; Stone, Rijnbrand et al. 2008). Le 2-furylmercury chloride et les flavonoïdes inhibent pour leur part la réplication de l'ARN viral (Van Hoof, Vanden Berghe et al. 1984; Verheyden, Andries et al. 2004).

La **ribavirine**, analogue de nucléoside qui inhibe un grand nombre de virus à ADN et ARN, est également actif contre le RVH-2 dans les cellules HeLa (Andersen, Weber et al. 1991; De Clercq, Murase et al. 1991) (**Figure 19**).

L'**enviroxime**, un dérivé de benzimidazole inhibe l'infection par le RVH en interférant vraisemblablement avec la fonction de la protéine 3A ainsi que celle d'un complexe de

protéines virales et cellulaires (Heinz and Vance 1995; Heinz and Vance 1996). Des études ont montré l'efficacité de l'enviroxime chez des sujets traités de manière prophylactique avec ce composé puis infectés avec le RVH-9 (Phillpotts, Wallace et al. 1983). En revanche, la molécule n'était pas active sur le RVH-4 et le RVH-39 et chez les sujets infectés de manière naturelle par le RVH du fait d'une faible biodisponibilité et de quelques effets secondaires (Phillpotts, Jones et al. 1981; Hayden and Gwaltney 1982; Levandowski, Pachucki et al. 1982; Miller, Monto et al. 1985). Du fait de son caractère hydrophobe et de sa toxicité, l'enviroxime a été incorporée dans des liposomes et son effet a été testé sur la réplication du RVH *in cellulo* (Wyde, Six et al. 1988). Il a ainsi été montré que, sous cette forme, l'enviroxime avait le même effet inhibiteur sur la réplication du RVH-1A et du RVH-13 et était 10 à 50 fois moins toxique que son équivalent utilisé sous une forme libre. De plus, les liposomes contenant l'enviroxime ont pu être administrés de manière efficace par de petites particules d'aérosols dans les voies respiratoires supérieures et inférieures chez la souris. Sur la base de ce composé, d'autres inhibiteurs ont été mis au point mais aucun d'entre eux n'a fait l'objet d'études cliniques (Victor, Brown et al. 1997; Victor, Loncharich et al. 1997; Hamdouchi, de Blas et al. 1999; Hamdouchi, Ezquerro et al. 1999).

1.6.6. Utilisation de siRNA

De petits ARN interférents (ou siRNA) ont été utilisés pour inhiber la réplication du RVH. Phipps et al., ont mis au point une série de siRNA double brins de 21 à 25 nucléotides ciblant différentes régions du génome du RVH-16 et inhibant de manière séquence-spécifique et dose-dépendante la réplication du RVH-16 dans les cellules HeLa (Phipps, Martinez et al. 2004).

1.6.7. Des produits naturels pour lutter contre le RVH

Les produits naturels présentant des propriétés antivirales contre le RVH peuvent être issus des plantes, champignons, protozoaires, insectes et autres sources animales. Ils peuvent être divisés en deux catégories : (i) les molécules naturelles purifiées

individuellement et (ii) les mélanges naturels de plusieurs constituants. Les effets biologiques de ces derniers varient en fonction de l'espèce utilisée, du moment de prélèvement et de la méthode de préparation. En particulier, les études cliniques menées avec des plantes médicinales souffrent d'un manque de comparabilité du fait de protocoles d'extraction ou de préparation différents et de protocoles d'études cliniques également différents.

Plusieurs substances naturelles montrent une certaine efficacité pour lutter contre les infections virales en général et contre le RVH en particulier. Certaines ciblent l'attachement du virus à son récepteur cellulaire, d'autres modulent la réponse immunitaire et présentent des propriétés anti-inflammatoires. Si certaines sont le fruit de plusieurs années de recherche, d'autres en revanche, ont été transmises de générations en générations.

1.6.7.1. *Echinacea* (*E. angustifolia*, *E. purpurea*, *E. pallida*)

Les échinacées font partie des plantes médicinales les plus vendues aux Etats-Unis et sont préconisées pour la prévention et le traitement du rhume et de la grippe (Blumenthal 2005). Plus d'une trentaine d'études cliniques ont été entreprises pour mesurer l'efficacité des échinacées dans le traitement du rhume et les résultats sont parfois contradictoires. En 2008, Woelkart et *al.*, a montré, à partir d'une méta-analyse réalisée sur plusieurs essais cliniques indépendants, que l'efficacité des échinacées n'est pas toujours évidente (Linde, Barrett et al. 2006; Schoop, Klein et al. 2006; Shah, Sander et al. 2007; Woelkart, Linde et al. 2008). Cependant, il semblerait que des extraits obtenus à partir des parties aériennes de *Echinacea purpurea* puissent présenter des propriétés antivirales en réduisant la durée des symptômes du rhume de 1,4 jour en moyenne chez l'adulte.

1.6.7.2. *L'ail* ou *Allium sativum*

L'ESCOP (european scientific cooperative on phytotherapy) reconnaît l'usage de l'ail pour traiter les infections des voies respiratoires. À ce jour, les quelques essais cliniques

publiés sont insuffisants pour établir une réelle efficacité des suppléments d'ail (Lissiman, Bhasale et al. 2009). Cependant, une étude publiée en 2001 a montré que parmi 146 sujets traités, ceux ayant pris 1 capsule d'ail durant 12 semaines de novembre à février ont eu moins de rhumes que ceux du groupe placebo (24 contre 65) (Josling 2001). De plus, lorsqu'ils étaient enrhumés, les patients traités voyaient leurs symptômes se résorber plus rapidement. Une étude menée en Russie auprès de 41 enfants a également donné des résultats positifs (Andrianova, Sobenin et al. 2003).

Sur un plan mécanistique, les bulbes d'ail renferment de l'alliine qui lorsque l'ail est coupé ou broyé rentre en contact avec un enzyme, l'alliinase, pour former l'allicine. Cette dernière se fixe sur la capsid du RVH-2 entraînant ainsi l'inhibition de l'entrée du virus dans la cellule (Weber, Andersen et al. 1992).

1.6.7.3. Le ginseng d'Amérique du Nord (*Panax quinquefolium*)

Les molécules actives des ginsengs sont les ginsénosides : elles sont connues pour avoir de nombreuses propriétés notamment anticancéreuses, antidiabétiques et antivirales en stimulant la système immunitaire.

Ainsi, la prise d'un extrait normalisé de ginseng américain (COLD-fx®, 400 mg par jour pendant 4 mois) par 270 personnes sujettes au rhume a été plus efficace qu'un placebo pour réduire l'intensité et la durée des symptômes (Predy, Goel et al. 2005). De plus, seulement 10 % des personnes du groupe expérimental ont eu plus d'un rhume, contre 23 % dans le groupe placebo.

1.6.7.4. Géranium du Cap (*Pelargonium sidoides*)

Plusieurs essais cliniques indiquent que l'extrait végétal liquide de *Pelargonium sidoides* (EPs 7630®) soulage les symptômes de la bronchite aiguë, du rhume et des sinusites et en accélère la rémission plus efficacement qu'un placebo (Matthys, Eisebitt et al. 2003; Chuchalin, Berman et al. 2005; Matthys and Heger 2007; Matthys and Heger 2007; Matthys, Kamin et al. 2007). Il reste à présent à évaluer les effets directs du géranium sur les infections à RVH.

1.6.7.5. Les carrageenan (ou carraghénanes)

Les carrageenan sont un mélange de polysaccharides principalement extrait d'algues rouges et possèdent des propriétés antivirales contre l'herpès simplex virus et le RVH (Gonzalez, Alarcon et al. 1987; Carlucci, Scolaro et al. 2004). En particulier, l'iota-carragenan utilisé à raison de 200 µg/ml inhibe totalement la réplication du RVH-2 dans des cellules HeLa (Grassauer, Weinmuellner et al. 2008).

1.6.7.6. Le zinc

Le zinc est également un inhibiteur des infections à RVH. En particulier, il a été démontré que le zinc inhibe la réplication du RVH *in vitro*, bloque la fixation du virus à son récepteur ICAM-1, altère la conformation des protéines de capside et réduit la sécrétion d'histamines au cours de l'infection (Butterworth and Korant 1974; Korant and Butterworth 1976; Harisch and Kretschmer 1987; Novick, Godfrey et al. 1996). Les effets du zinc sur les infections à RVH ont également été étudiés au cours de 13 essais cliniques mettant en jeu 966 individus au total (Singh and Das). Tous ont commencé un traitement au zinc dans les 3 jours suivant l'apparition des symptômes du rhume et ce pendant au moins 5 jours. Lorsqu'administré dans les 24 h après l'apparition des premiers symptômes, le zinc a permis de réduire significativement la durée et la sévérité des symptômes. Dans une autre étude, le zinc a réduit la durée mais pas la sévérité des symptômes (Science, Johnstone et al.). Ces différences peuvent s'expliquer par des protocoles d'études cliniques différents. Lorsqu'utilisé en préventif sous forme de cure d'au moins 5 mois, le zinc a été associé à moins : (i) d'épisodes de rhume, (ii) d'absentéisme à l'école et (iii) de prescriptions d'antibiotiques chez l'enfant (Singh and Das).

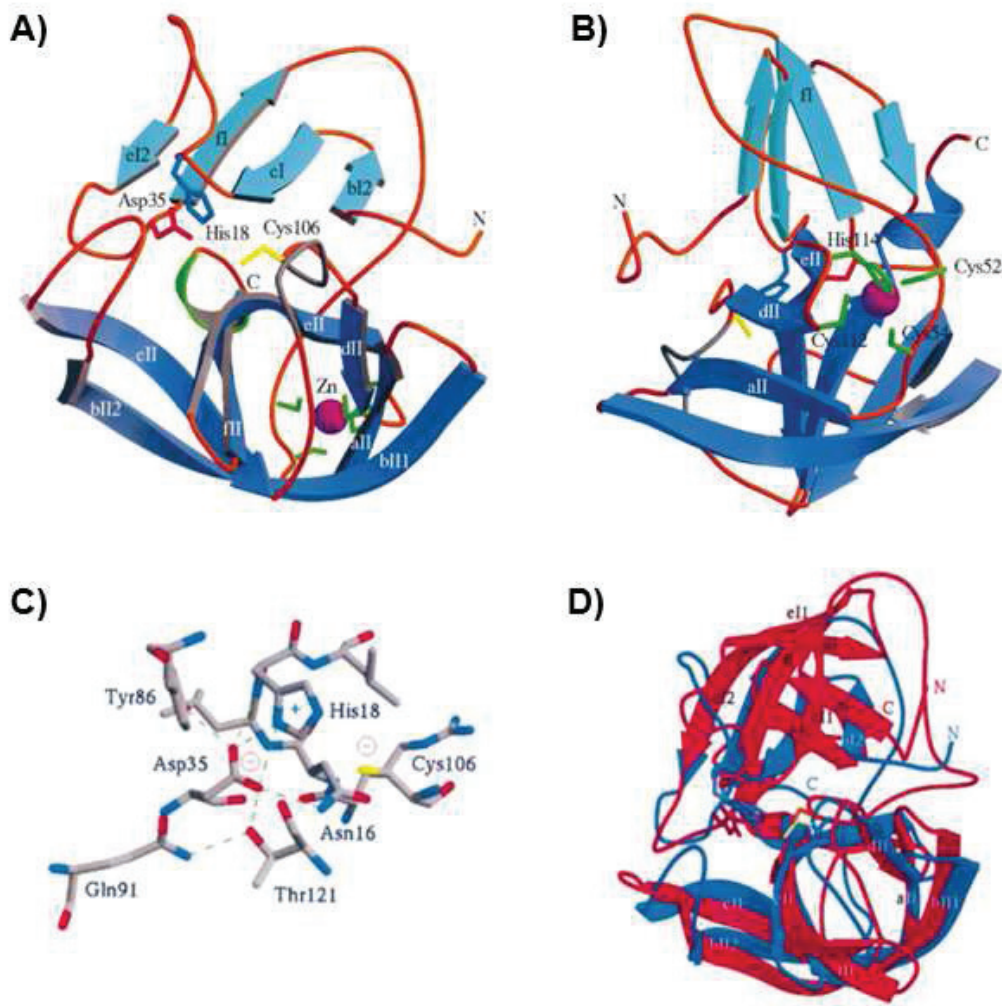


Figure 20. Structure de la protéase 2A du RVH-2.

(A) Structure de la 2A^{pro} du RVH-2. Les brins sont numérotés selon la topologie de Read et *al.* (1983). Les brins bêta du domaine N-terminal sont représentés en bleu clair et ceux du domaine C-terminal sont en bleu foncé. Les résidus de la triade catalytique ainsi que l'ion zinc et les résidus interagissant avec cet ion sont indiqués. (d'après Petersen et *al.* 1999).

(B) Site de fixation à l'ion zinc de la 2A^{pro} du RVH-2. Cette vue résulte d'une rotation de 180° par rapport à celle représentée figure 1A. Les résidues interagissant avec l'ion zinc (en violet) sont représentés en vert. (d'après Petersen et *al.* 1999)

(C) Représentation des liaisons hydrogène formées au sein du site actif de la protéase 2A du RVH-2. (d'après Petersen et *al.* 1999)

(D) Comparaison de la protéase 2A du RVH-2 (en bleu) avec la protéase B du *Streptomyces griseus* (en rouge). (d'après Petersen et *al.* 1999)

2. La protéase 2A du rhinovirus humain

Si un grand nombre de composés décrits précédemment ont été testés pour leur capacité à inhiber la réplication du rhinovirus humain, aucun d'entre eux n'a abouti cependant à la mise sur le marché d'un traitement antiviral efficace. La protéase virale 2A du RVH qui joue un rôle fondamental au cours du cycle infectieux est devenue une cible thérapeutique particulièrement étudiée au cours de ces dernières années.

2.1. Structure de la protéase 2A

2.1.1. Description générale de la structure

La structure cristallographique de la 2A^{pro} du RVH-2 révèle une organisation en deux domaines de la protéine avec un domaine N-terminal (résidus 1 à 39) formant un feuillet bêta constitué de 4 brins bêta (bI2, cI, eI2 et fI), un domaine C-terminal (résidus 52 à 132) formant un tonneau bêta à 6 brins (aII, bII1, bII2, cII, dII, eII et fII) et une boucle intermédiaire (résidus 40 à 52) reliant ces 2 régions (**Figure 20A**) (Petersen, Cherney et al. 1999).

Plusieurs études montrent qu'il existe une forte interaction entre la 2A^{pro} et un ion Zn^{2+} . Dans cette liaison qui serait importante pour le maintien de la structure de la protéase, le positionnement de l'ion est tétraédrique (**Figure 20B**) : il se lie aux cystéines Cys52 et Cys54 situées dans la boucle intermédiaire et à la cystéine Cys112 et l'histidine His114 localisées dans le domaine C-terminal (Sommergruber, Casari et al. 1994; Voss, Meyer et al. 1995). Ces quatre résidus sont très conservés au sein des 2A^{pro} (Petersen, Cherney et al. 1999). Cependant, l'ion Zn^{2+} n'est pas impliqué directement dans le processus catalytique.

2.1.2. La triade catalytique de la 2A^{pro}

La 2A^{pro} appartient à la famille des protéases à cystéine. Ces enzymes possèdent un mécanisme catalytique qui met en jeu un résidu nucléophile, la cystéine. Les

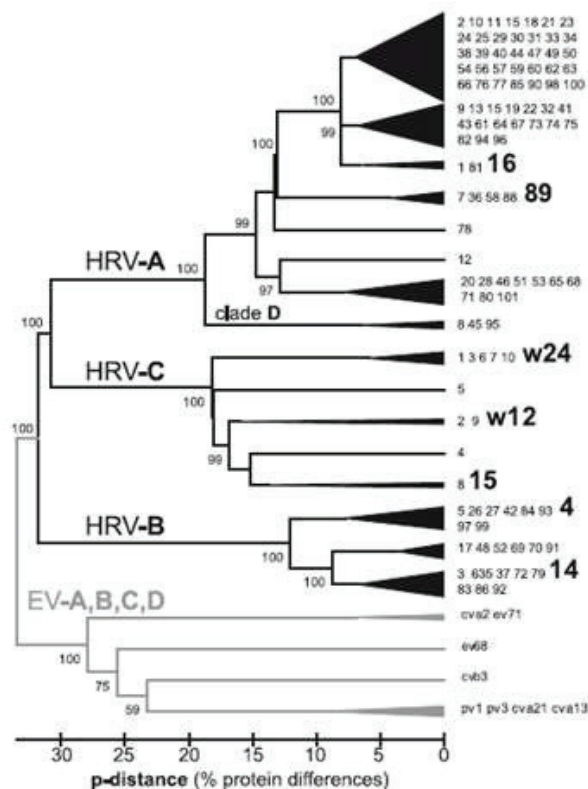


Figure 21. Arbre phylogénétique des protéases 2A des rhinovirus humains.

L'arbre a été construit selon l'algorithme du « neighbor-joining » basé sur le principe selon lequel la distance évolutive estimée entre des séquences homologues est fonction de la divergence observée entre des paires de séquences homologues. La distance p prend en compte les similarités et les identités de séquences. Les espèces ayant un score p inférieur à 10 % ont été rassemblées dans un même groupe. (d'après Watters, 2011)

représentants les plus connus de cette famille sont les caspases qui jouent un rôle clé dans l'inflammation et l'apoptose.

Le site actif de la 2A^{pro} du RVH-2 consiste en une triade catalytique impliquant l'histidine His18, l'aspartate Asp35 et la cystéine Cys106. Ces résidus sont localisés à la jonction entre les domaines N- et C-terminaux et leur rôle dans les activités catalytiques de la 2A^{pro} a été démontré par mutagenèse dirigée (Sommergruber, Seipelt et al. 1997).

Les résidus de la triade catalytique établissent des liaisons hydrogène avec plusieurs résidus de la protéase 2A. Ces liaisons sont essentielles aux activités de clivage de l'enzyme viral. En particulier, l'Asp35 forme des liaisons hydrogènes avec l'His18, l'Asn16, la Tyr86 et la Thr121. La Thr121 établit une liaison hydrogène avec la Gln 91 (**Figure 20C**). L'ensemble de ces résidus sont très conservés chez les protéases 2A entérovirales et une mutation du type Asn16Ala par exemple inactive complètement l'enzyme (Sommergruber, Seipelt et al. 1997; Petersen, Cherney et al. 1999). De la même manière, le remplacement de la Thr121 par une asparagine réduit considérablement l'activité de la protéase (Yu and Lloyd 1991).

2.1.3. Diversité au sein des protéases 2A du RVH

Le séquençage des génomes des RVH des groupes A, B et C a permis de mieux comprendre les divergences qui existent au sein des 2A^{pro} des rhinovirus (Palmenberg, Rathe et al. 2010). Seuls 28 des 142 résidus de l'enzyme sont conservés au sein de toutes les protéases 2A séquencées à ce jour (n=144) (Watters and Palmenberg). Au sein d'un même groupe, les 2A^{pro} peuvent présenter des homologies de séquences variant entre 61 % et 99 %. Entre les groupes, les homologies varient de 31 % (entre RVH-A101 et RVH-B99) à 68 % (entre RVH-A25 et RVH-C10) (**Figure 21**). De telles variabilités pourraient expliquer les affinités différentes des 2A^{pro} des RVH vis-à-vis d'un même substrat (Watters and Palmenberg).

2.1.4. Comparaison avec la protéase 3C du RVH

Les protéases 2A et 3C du rhinovirus sont toutes deux des protéases à cystéine qui ne sont pas inhibées par certains inhibiteurs classiques de cette catégorie d'enzyme comme le E-64 (Sommergruber, Ahorn et al. 1992; Molla, Hellen et al. 1993; Wang, Sommergruber et al. 1997). Les structures de la protéase 3C du RVH-2 et du RVH-14 ont été décrites en 1994 (Matthews, Smith et al. 1994). Elles montrent que la protéase est organisée en deux tonneaux bêta constitué chacun de six feuillets bêta. Comme pour la 2A^{pro}, une boucle intermédiaire est également présente chez la 3C^{pro}. Elle contient un motif consensus Lys-Phe-Arg-Asp-Ile impliqué dans la reconnaissance des ARN (Matthews, Smith et al. 1994; Mosimann, Cherney et al. 1997; Seipelt, Guarne et al. 1999). Ce motif est en revanche absent chez la 2A^{pro}. La protéase 3C possède aussi une triade catalytique His-40, Glu-71 et Cys-146 (chez le RVH-14). La topologie du site actif de la 2A^{pro} du RVH est donc proche de celle de la 3C^{pro} à la différence près que le 3^e résidu catalytique est un Asp chez la 2A^{pro} et une Glu chez la 3C^{pro} (Mosimann, Cherney et al. 1997). De plus, les protéases virales 2A et 3C présentent toutes deux un repliement et un fonctionnement proches des chymotrypsine-like protéases.

2.1.5. Comparaison avec les chymotrypsine-like protéases

L'alignement des séquences des 2A^{pro} et 3C^{pro} des RVH avec celles des chymotrypsines montrent que ces enzymes présentent un repliement semblable (Toyoda, Nicklin et al. 1986; Bazan and Fletterick 1988; Gorbalenya, Donchenko et al. 1989). En particulier, la superposition de la structure de la 2A^{pro} du RVH-2 avec celle d'un représentant des chymotrypsine-like protéases, la protéase B de *Streptomyces griseus* montre que malgré une homologie de séquence inférieure à 20 %, le repliement et la structure des deux protéases sont sensiblement proches (**Figure 20D**). La principale différence réside au niveau du domaine N-terminal qui est sous forme de 4 brins bêta chez la protéase virale et 8 chez la protéase bactérienne (Petersen, Cherney et al. 1999). Le site actif de 2A^{pro} du RVH-2 semble avoir plus de points communs avec la triade catalytique des chymotrypsine-like protéases à sérine qu'avec la 3C^{pro} car chez les premières, le 3^e résidu de la triade est également un aspartate.

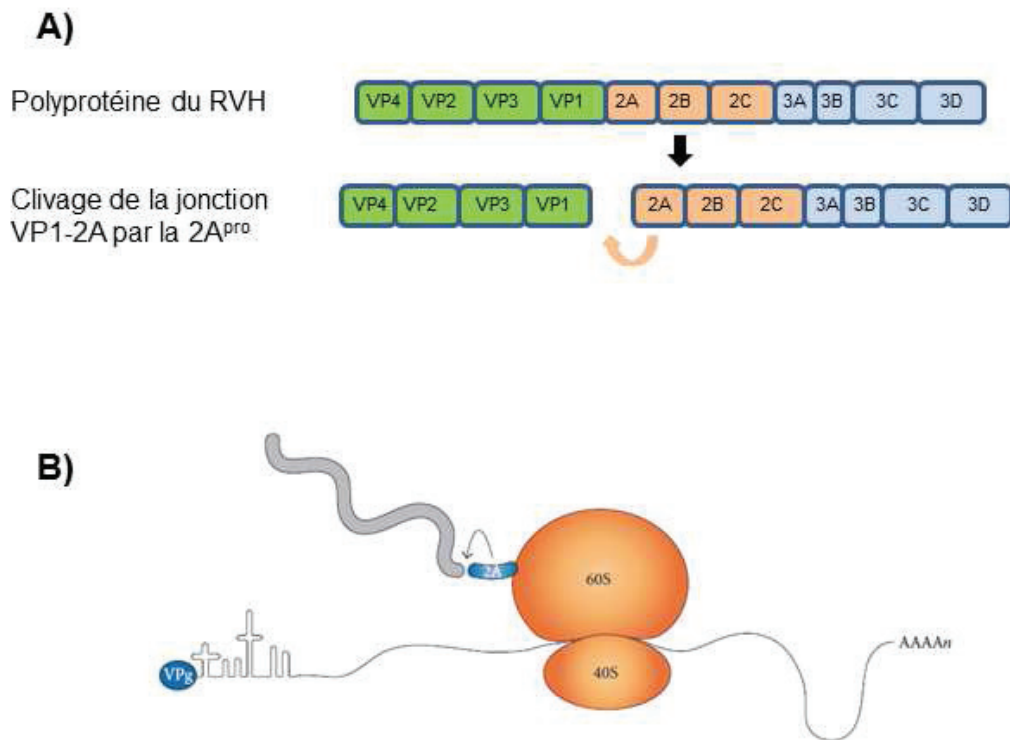


Figure 22. La 2A^{pro} assure la première étape de maturation de la polyprotéine virale.

(A) La protéase 2A du RVH assure la première étape de la maturation de la polyprotéine virale.
 (B) Traduction et maturation de la polyprotéine du RVH. Modèle selon lequel une fois synthétisée, la 2A^{pro} clive la polyprotéine au niveau de la région VP1-2A alors que le ribosome est toujours fixé. D'après .(Castello, Alvarez et al.).

2.2. Rôle de la 2A^{pro} au cours de l'infection virale

2.2.1. La 2A^{pro} assure la première étape de maturation de la polyprotéine virale

La protéase 2A assure la première étape d'autoclivage de la polyprotéine du RVH entre l'extrémité C-terminale de VP1 et sa propre extrémité N-terminale (**Figure 22A**) (Toyoda, Nicklin et al. 1986). Ce clivage aurait lieu alors que la polyprotéine est encore fixée au ribosome (Toyoda, Nicklin et al. 1986) (**Figure 22B**). Une autre hypothèse suggère que la maturation serait post-traductionnelle. Ce clivage en *cis* est particulier puisque le résidu P1' du site de clivage est aussi le résidu N-terminal de la protéase 2A (d'après la nomenclature de Schechter and Berger (Schechter and Berger 1968), les résidus à gauche du site de clivage sont nommés P1 à P6 et ceux à droite, sont nommés P1' à P6'. Ils interagissent respectivement avec les résidus des poches de fixation du substrat S1 à S6 et S1' à S6' de la protéase 2A, **Figure 23**).

L'étude de la jonction VP1-2A ainsi que des mutations ponctuelles des résidus de cette séquence ont permis de mieux comprendre les spécificités de clivage de la protéase 2A du RVH. En particulier, il a été démontré que les oligopeptides dérivés de cette jonction (Thr-Arg-Pro-Ile-Ile-Thr-Thr-Ala*Gly-Pro-Ser-Asp-Met pour la polyprotéine du RVH-2) sont également clivés en *trans* par la 2A^{pro} (Sommergruber, Ahorn et al. 1992). Ils ont ainsi permis d'étudier les spécificités de clivage de l'enzyme viral et de mettre au point des inhibiteurs compétitifs de la protéase. Les spécificités de clivage de la 2A^{pro} sont décrites en détails dans le paragraphe 2.3.

2.2.2. Rôle de la protéase 2A dans la réplication du génome viral

La 2A^{pro} serait directement impliquée dans la réplication du génome viral. Il a notamment été démontré qu'un ARN viral délété de la région 2A se réplique moins vite qu'un ARN viral sauvage (Collis, O'Donnell et al. 1992). Dans ces mêmes conditions, le taux de réplication a pu être rétabli après transfection d'un ARN codant pour la 2A^{pro}. En particulier, la région C-terminale de la 2A^{pro} jouerait un rôle dans la réplication (Li, Lu et al. 2001). Jurgens et al., (2006) ont montré que l'activité protéolytique de la 2A^{pro} réplique de polarité négative (Jurgens, Barton et al. 2006). En revanche, elle n'affecte

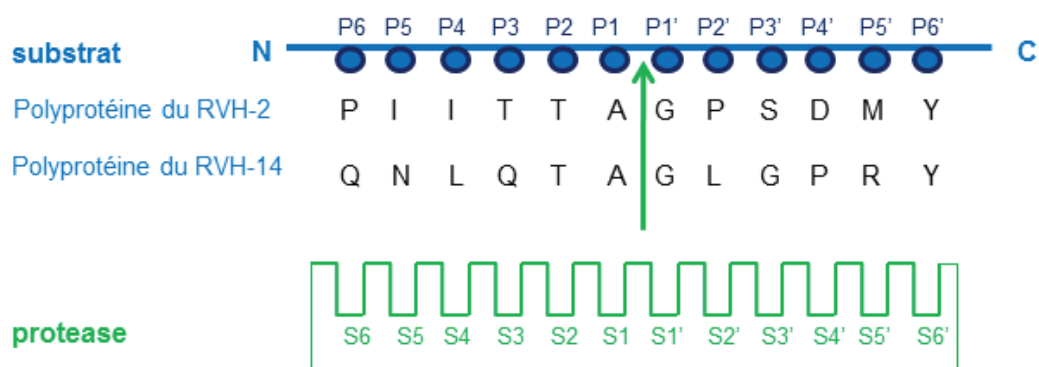


Figure 23. Schéma explicatif de la nomenclature de Schechter et Berger.

Les sites de clivage par la 2A^{pro} des polyprotéines du RVH-2 et du RVH-14 sont représentés. La flèche verte indique le site de clivage. D'après la nomenclature de Schechter and Berger (Schechter and Berger 1968), les résidus à gauche du site de clivage sont nommés P1 à P6 et ceux à droite, sont nommés P1' à P6'. Ils interagissent respectivement avec les résidus des poches S1 à S6 et S1' à S6' de la protéase 2A.

pas la synthèse du brin positif. Selon cette même équipe, la 2A^{pro} modifierait et stimulerait un facteur cellulaire essentiel à la synthèse du brin négatif mais pas du brin positif. Enfin, la 2A^{pro} du PV a été détectée au niveau des sites de réplication de l'ARN viral confortant l'implication de cet enzyme dans la réplication du génome du poliovirus (Teterina, Levenson et al. 2010).

2.2.3. Clivage du facteur eIF4G et shut-off cellulaire

La protéine eIF4G est un facteur essentiel à l'initiation de la traduction des ARN messagers. Dans le cas des ARNm coiffés, le facteur eIF4E lie la coiffe et recrute eIF4A et eIF4G pour former le complexe eIF4F qui favorise ensuite le recrutement des ribosomes au niveau de la coiffe via le facteur eIF3 (**Figure 24A**) (Gingras, Raught et al. 1999). eIF4G interagit également avec la protéine PABP, elle-même liée à la queue poly-A de l'ARNm, favorisant la circularisation de l'ARNm (Wells, Hillner et al. 1998; Svitkin, Gradi et al. 1999) (**Figure 24B**). Il existe deux formes de eIF4G, eIF4GI et eIF4GII. Ces deux formes sont interchangeable car même si elles ne partagent que 46 % d'homologie de séquences, leurs domaines d'interactions avec d'autres facteurs cellulaires sont conservés. Aucun autre rôle spécifique à chacune de ces deux formes n'a été attribué.

L'infection par le RVH entraîne un rapide phénomène de « shut-off » cellulaire se traduisant par l'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires coiffés. Ce phénomène est dû à l'hydrolyse par la 2A^{pro} des facteurs eIF4GI et eIF4GII entre les résidus Arg681-Gly682 et Arg699-Gly700 respectivement (**Figure 24C**) (Etchison and Fout 1985; Lamphear, Yan et al. 1993; Svitkin, Gradi et al. 1999). Ce clivage sépare les domaines N- et C-terminaux de eIF4G contenant respectivement les domaines d'interaction à eIF4E et eIF3 empêchant ainsi le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome (**Figure 24D**). Le groupe de Sonenberg a proposé que le shut-off cellulaire nécessite le clivage de chacun des deux facteurs eIF4GI et eIF4GII et qu'il dépend tout particulièrement de leur taux d'hydrolyse. Le clivage d'eIF4G n'affecte pas la traduction IRES-dépendante et aurait même une action stimulante sur cette

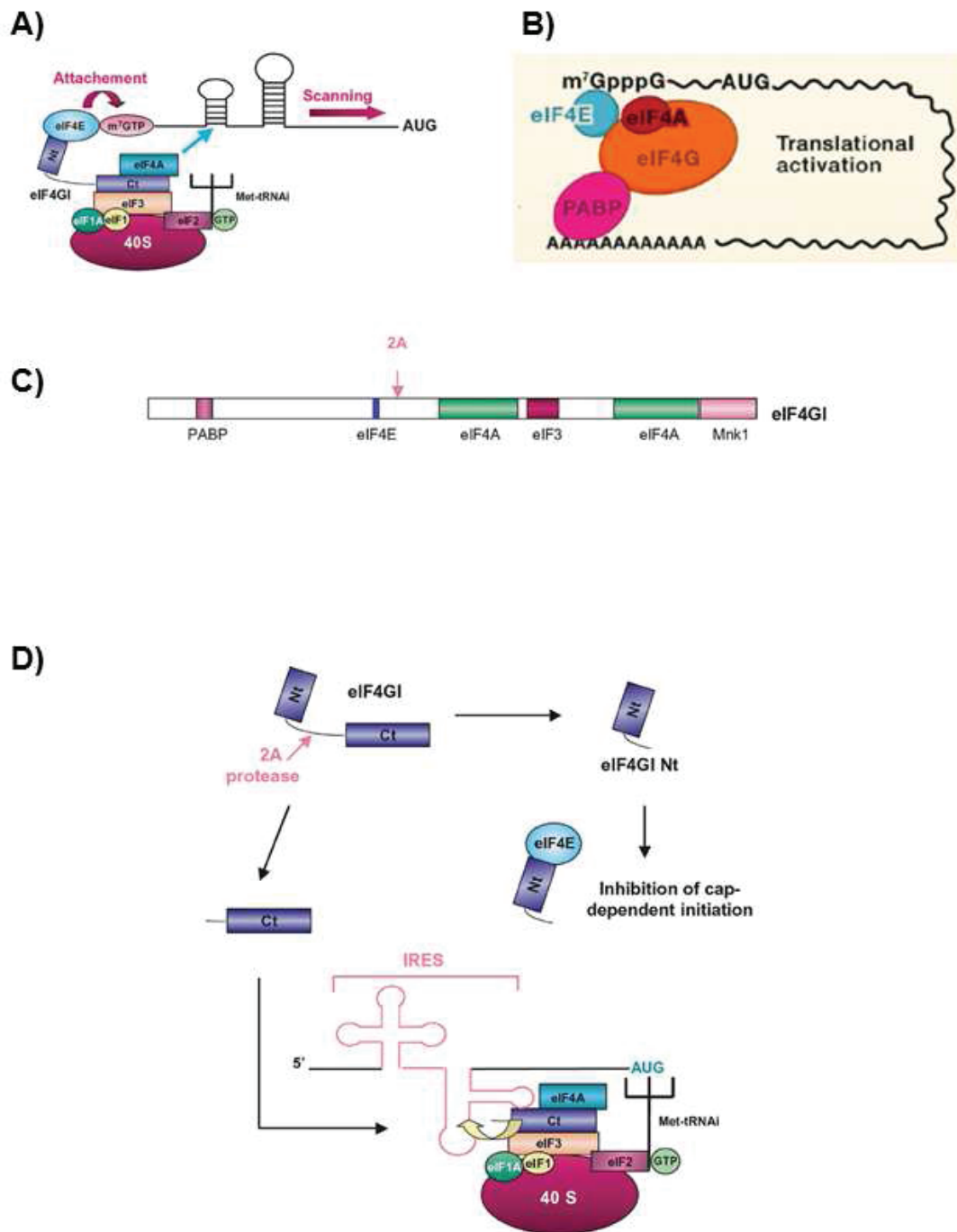


Figure 24. La 2A^{pro} clive le facteur eIF4G et participe au shut-off cellulaire.

(A) L'initiation de la traduction des ARN messagers coiffés (m⁷GpppG) nécessite l'intervention d'un complexe protéique appelé eIF4F composé de trois protéines : (i) eIF4A, une ARN hélicase; (ii) eIF4E, qui se lie à la coiffe et (iii) eIF4G. (D'après Prevot et *al.* 2003)

(B) eIF4G interagit également avec la protéine PABP, elle-même liée à la queue poly-A de l'ARNm, favorisant la circularisation de l'ARNm. (d'après Sonenberg et *al.* 2009)

(C) Représentation schématique de eIF4G. Les domaines d'interaction à la PABP et aux facteurs eIF4E, eIF4A et eIF3 sont représentés. Le site de clivage par la 2A^{pro} est également indiqué. Mnk 1: mitogen-activated protein kinase 1. (Adapté de Prevot et *al.* 2003)

dernière (Thompson and Sarnow 2003). Toutes les 2A^{pro} des différents RVH semblent cliver eIF4G au niveau du même site. En revanche, le taux d'hydrolyse varie selon les espèces : RVH-A > RVH-C >> RVH-B (Watters and Palmenberg).

Les infections par d'autres membres du genre entérovirus conduisent également à l'hydrolyse du facteur PABP. Il a été montré notamment que la 2A^{pro} du poliovirus et du coxsackievirus et la 3C^{pro} du poliovirus clivent la PABP (Joachims, Van Breugel et al. 1999; Kerekatte, Keiper et al. 1999). Aucun rôle similaire pour la 2A^{pro} du rhinovirus humain n'a été décrit.

2.2.4. Clivage des protéines du pore nucléaire et perturbation du trafic entre le noyau et le cytoplasme

Le cycle réplcatif du RVH se déroule uniquement dans le cytoplasme des cellules infectées. Pourtant, plusieurs articles montrent que certaines protéines du rhinovirus peuvent être localisées dans le noyau des cellules infectées (Amineva, Aminev et al. 2004; Sharma, Raychaudhuri et al. 2004; Ghildyal, Jordan et al. 2009). En particulier, la 2A^{pro} cible les nucléoporines (Nups) du pore nucléaire (Watters and Palmenberg; Gustin and Sarnow 2001).

Les pores nucléaires sont de grands complexes protéiques (poids moléculaire estimé à 125 000 kDa) traversant l'enveloppe nucléaire et présentant une symétrie d'ordre 8. Ils permettent les échanges entre le noyau et le cytoplasme de diverses molécules : ARN, facteurs de transcription, polymérases, facteurs d'épissage, etc. Le pore est constitué de deux anneaux (l'un nucléaire et l'autre cytoplasmique) de symétrie radiale orthogonale. Sa face cytoplasmique comporte 8 fibrilles de 50 nm de long s'étendant vers le cytoplasme tandis que la face nucléaire comporte des fibrilles qui se rejoignent pour former une structure en forme de panier de 100 nm de hauteur (**Figure 25A**).

(D) Le clivage de eIF4G par la 2A^{pro} sépare le domaine N-terminal contenant le domaine d'interaction à eIF4E et le domaine C-terminal contenant le domaine d'interaction à eIF3 empêchant le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome. (Adapté de Prevot et al. 2003)

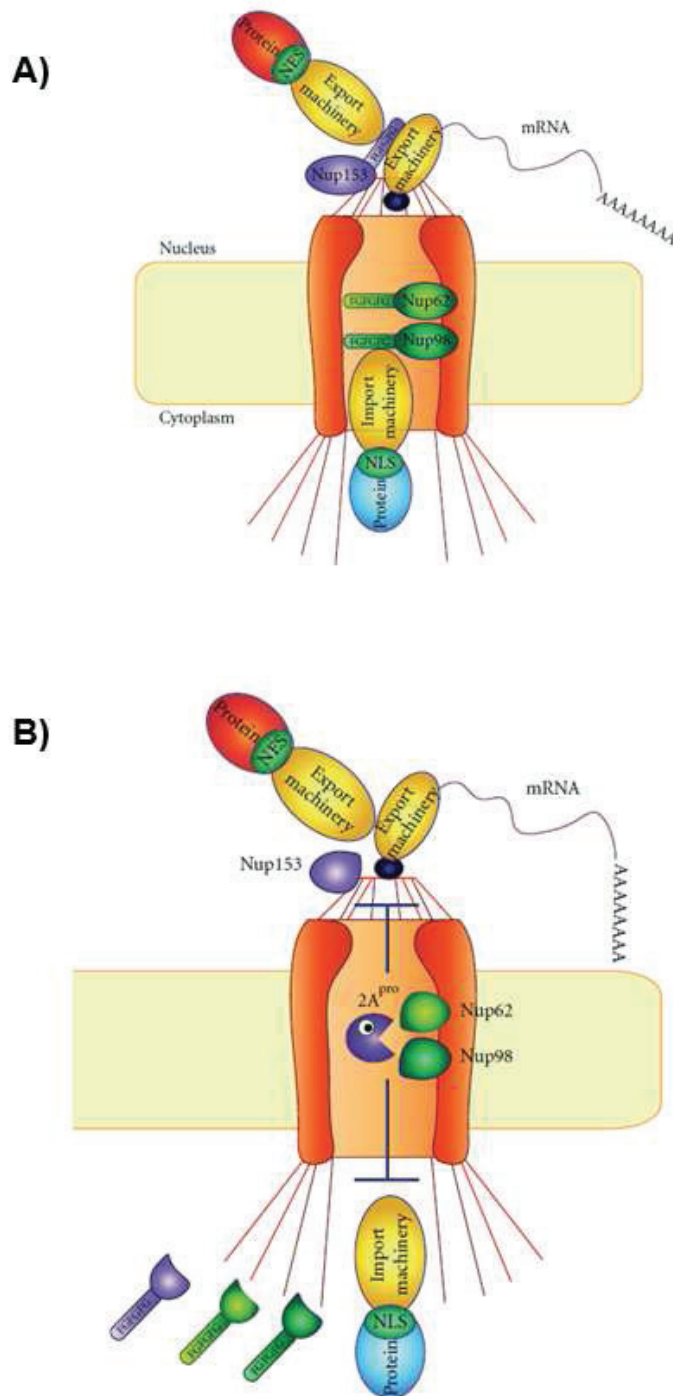


Figure 25. Inhibition du trafic nucléo-cytoplasmique par la protéase 2A. (d'après Castello, 2011).

(A) Les protéines (en bleu) et les ARN sont importés et exportés *via* les complexes protéiques du pore nucléaire et en particulier les nucléoporines à domaines FG (Nup62, Nup98 et Nup153). (B) Le clivage par la 2A^{pro} des Nups riches en FG provoque le relargage des domaines FG et perturbe le transport des protéines et ARN.

Les pores nucléaires sont constitués de plusieurs copies (8, 16 ou 32) d'une trentaine de protéines Nups classées en trois groupes : (i) les nucléoporines contenant des domaines riches en phénylalanine et glycine (domaines FG) qui participent activement au transport des macromolécules (Nup62, Nup98, et Nup153), (ii) les nucléoporines ayant un rôle structural qui ne contiennent pas ce type de domaine et (iii) les protéines assurant l'ancrage du complexe dans l'enveloppe nucléaire.

Les protéines Nup62, Nup98 et Nup153 sont clivées par la 2A^{pro} au cours de l'infection par le RVH (Gustin and Sarnow 2002). Nup98 est clivée dès les premières heures d'infection tandis que Nup62 et Nup153 sont clivées plus tardivement (Gustin and Sarnow 2001; Park, Katikaneni et al. 2008). Leur clivage libérerait le domaine FG et empêcherait ainsi leurs interactions avec les ARN et les protéines à transporter (**Figure 25B**) (Park, Skern et al.). Dans le cas du poliovirus, il a été démontré que ces clivages corrélaient avec l'accumulation de facteurs nucléaires (antigène La, PTB, Sam68, nucléoline, etc) dans le cytoplasme ce qui favoriserait la réplication du virus (Meerovitch, Svitkin et al. 1993; McBride, Schlegel et al. 1996; Waggoner and Sarnow 1998; Gustin and Sarnow 2001). De la même manière, plusieurs facteurs de transcription (NF-kappabêta, IRF7 et IRF3) favorisant l'expression de gènes de la réponse inflammatoire sont bloqués dans le cytoplasme au cours de l'infection ce qui permettrait au virus d'échapper à l'induction d'une réponse antivirale (Ranjan, Bowzard et al. 2009). Enfin, l'expression de la 2A^{pro} du PV bloque l'export des ARNm codant pour IL-6, c-myc et P53 empêchant l'induction de l'apoptose et d'une réponse pro-inflammatoire dès les phases précoces de l'infection (Castello, Izquierdo et al. 2009).

Les sites de clivage des protéines Nup par les protéases 2A des RVH sont multiples et leur taux d'hydrolyse varie selon les espèces : RVH-A > RVH-C >> RVH-B pour Nup62, RVH-A et RVH-C > RVH-B pour Nup98 et RVH-B >> RVH-C > RVH-A pour Nup153 (Watters and Palmenberg).

2.2.5. Protéase 2A et désorganisation du cytosquelette

Le cytosquelette est formé de trois constituants : les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires. La 2A^{pro} du RVH-2 clive la cytokératine 8 (K8) un des

constituants des filaments intermédiaires. La cytokératine 8 est une protéine basique jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette. Son hydrolyse entraîne la libération des 14 résidus situés à son extrémité N-terminale. Le clivage a lieu dans les phases tardives du cycle de réplication et entraînerait une désorganisation du cytosquelette favorisant ainsi la libération des virions néoformés (Seipelt, Liebig et al. 2000). De plus, dans des cellules HeLa infectées par le poliovirus, une désorganisation du cytosquelette a été décrite et la 2A^{pro} du CVB3 clive la dystrophine dans les myocytes (Lenk and Penman 1979; Badorff, Lee et al. 1999).

2.2.6. Protéase 2A et épissage alternatif

Les protéines SMN (survival of motor neurons) en association avec les protéines gémines participent à la synthèse des U snRNP (uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein) impliqués dans l'épissage des ARN pré-messagers. La gémine 3 est clivée dans des cellules HeLa infectées par le poliovirus ou exprimant la 2A^{pro} (Almstead and Sarnow 2007). Cependant, ce clivage n'est pas détecté lorsque la protéase est exprimée après transfection des cellules par l'ARN du poliovirus. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de 2A^{pro} exprimée à partir de l'ARN viral est plus faible (Castello, Izquierdo et al. 2009). Le clivage de la gémine 3 est donc dépendant de la quantité de 2A^{pro}. Cependant, l'hydrolyse de la gémine 3 par la 2A^{pro} représente à ce jour une réaction dont le rôle biologique reste incompris.

2.2.7. Clivage de la protéine IPS-1 et inhibition de la réponse antivirale

Comme décrit précédemment, les infections à RVH induisent une réponse immunitaire innée dépendante de l'interféron bêta. Le récepteur TLR-3 et la protéine MDA-5 jouent un rôle essentiel dans la détection du RVH par le système immunitaire (Wang, Nagarkar et al. 2009). La protéase 2A joue également un rôle important dans le contournement de la réponse antivirale en conférant au RVH la capacité de se répliquer dans des cellules traitées à l'interféron de type I (Morrison and Racaniello 2009). De plus, la protéine IPS-1 (interféron-beta promoter stimulator 1), protéine interagissant avec MDA-5 et

intervenant dans l'induction de la production d'interféron bêta, est clivée par les protéases 2A et 3C au cours de l'infection. Ceci perturbe la production d'interférons de type I en réponse à l'infection et inhibe la mise en place d'une réponse antivirale de l'immunité innée (Barral, Morrison et al. 2007).

IRF3 (interferon regulatory factor 3) est un facteur de transcription dont la phosphorylation par la DNA PKcs (protéine kinase dépendante de l'ADN) stimule l'expression de gènes de la réponse antivirale. Au cours d'une infection à poliovirus, la DNA-PKcs est protéolysée par la 2A^{pro} ce qui entraîne une réduction de son activité kinase (Graham, Gustin et al. 2004).

2.2.8. 2A^{pro} et apoptose

Si l'expression transitoire de la 2A^{pro} dans des cellules suffit à activer la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose, aucune expérience n'a réellement montré en revanche une implication directe de la protéase dans ce processus (Goldstaub, Gradi et al. 2000; Kuo, Kung et al. 2002; Calandria, Irurzun et al. 2004; Chau, Yuan et al. 2007). Il semblerait cependant que la capacité de l'enzyme viral à cliver le facteur de traduction eIF4G et à perturber le cytosquelette puisse constituer des éléments à prendre en compte pour expliquer les phénomènes de mort cellulaire observés.

2.2.9. La 2A^{pro} est-elle essentielle à la réplication du RVH ?

Pendant plusieurs années, la protéase 2A a été considérée comme essentielle à la réplication du virus (Toyoda, Nicklin et al. 1986; Molla, Hellen et al. 1993). Cependant, une étude publiée en 2010 a montré qu'un ARN bicistronique codant pour le génome du poliovirus mais délété de la région 2A peut se répliquer et produire de nouveaux virions. Dans cette étude, des constructions délétées de la région P1 ont produit de nouveaux virions lorsque la région P1 était exprimée en *trans* suggérant que le clivage de la polyprotéine par la 2A^{pro} n'est pas essentiel à la réplication du virus (Igarashi, Yoshino et al.). La 2A^{pro} est néanmoins essentielle à l'induction du shut-off cellulaire et à la réplication des entérovirus dans les cellules traitées avec des interférons de type I et

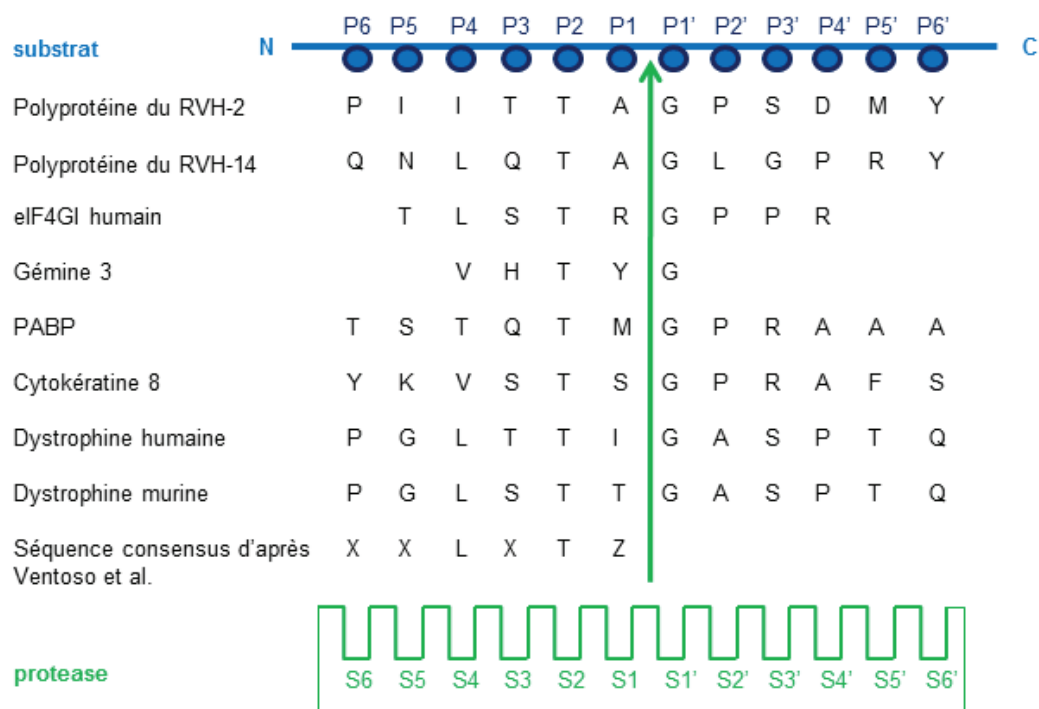


Figure 26. Représentation des sites de clivage connus des substrats naturels de la 2A^{pro} du rhinovirus.

La flèche verte indique le site de clivage et les résidus de part et d'autre du site sont positionnés selon la nomenclature de Schechter and Berger (Schechter and Berger 1968). La séquence consensus reconnue par la 2A^{pro} et identifiée par Ventoso et al est également représentée. X est un résidu quelconque et Z un résidu hydrophobe

semble jouer un rôle clé au cours de la réplication du génome viral (Morrison and Racaniello 2009; Teterina, Levenson et al. 2010).

2.3. Spécificités de clivage de la protéase 2A

Les spécificités de clivage de la protéase 2A du RVH au niveau de ses substrats naturels ont été déterminées essentiellement par la nature des résidus aux positions P1', P2 et P4 qui sont principalement et respectivement occupées par (i) une glycine, (ii) une asparagine ou une thréonine et (iii) une leucine ou une isoleucine. Les sites de coupure de différents substrats de la 2A^{pro} sont représentés dans la **figure 26**.

2.3.1. Stratégies mises en place pour définir les spécificités de clivage de la 2A^{pro} et identifier de nouveaux substrats

Comme la structure cristallographique de la 2A^{pro} du RVH-2 en complexe avec un substrat protéique n'a pas encore été déterminée, plusieurs stratégies ont été mises en place pour tenter de mieux comprendre les spécificités de clivage de l'enzyme :

(i) la première a consisté à étudier le taux d'hydrolyse différentielle par la 2A^{pro} de peptides dérivés des sites de clivage naturels de la protéase virale et portant aux positions P et P' différentes substitutions en amino-acides (Skern, Sommergruber et al. 1991; Sommergruber, Ahorn et al. 1992; hellen C. & Wimmer 1995; Wang, Sommergruber et al. 1997; Wang, Johnson et al. 1998; Badorff, Berkely et al. 2000; Badorff, Fichtlscherer et al. 2002; Sousa, Schmid et al. 2006),

(ii) une autre stratégie basée sur le système du double-hybride chez la levure a utilisé la 2A^{pro} du poliovirus comme protéine appât pour détecter des proies parmi une banque de cDNA issue de cellules HeLa (Ventoso, Barco et al. 1999). Il a été démontré ainsi que la séquence consensus reconnue par la 2A^{pro} est du type P4-Leu-X-Thr-Z-P1 où X est un résidu quelconque et Z un résidu hydrophobe. (iii) des outils bioinformatiques ont été mis au point pour prédire les cibles cellulaires des protéases des picornavirus (Blom, Hansen et al. 1996). C'est par cette méthode que la dystrophine a été identifiée comme cible de la 2A^{pro} du coxsackievirus. D'autres cibles potentielles identifiées par

cette approche n'ont pu être confirmées *in cellulo*. A l'inverse, cet algorithme n'a pas permis d'identifier initialement certaines protéines qui se sont révélées par la suite des cibles reconnues par la 2A^{pro} (Nup98, cytokératine 8).

(iv) des outils protéomiques tels que l'électrophorèse bidimensionnelle différentielle en gel de polyacrylamide ont été également utilisés pour identifier des substrats de la 2A^{pro} (cytokératine 8).

2.3.2. Le résidu P1'

L'analyse des alignements des séquences de la jonction VP1-P2A de 96 RVH des groupes A et B révèle que la position P1' est toujours occupée par une glycine (**Figure 27**). En 1992, Sommergruber and *al*, ont montré que la présence d'une glycine en P1' est nécessaire pour le clivage par la 2A^{pro} (Sommergruber, Ahorn et al. 1992). Dans cette étude, un peptide de 15 résidus (P8- P7') dans lequel la glycine en P1' a été remplacée par une lysine, une thréonine ou une phénylalanine, n'a pas été clivé par la 2A^{pro} du RVH-2. En revanche, en 1997, Wang et al, ont montré qu'un peptide du type TRPIITTA-p-nitroanilide était clivé par la 2A^{pro} du RVH-2 (Wang, Sommergruber et al. 1997). Ce dernier présente les caractéristiques suivantes : les positions P1 à P6 sont occupées par les mêmes résidus que ceux présents dans le site de clivage VP1-2A du RVH-2 alors que les positions en P' sont toutes occupées par la p-nitroanilide. Dans cette configuration, les résidus en amont du site de clivage suffisent donc à la reconnaissance et à l'hydrolyse du peptide par la 2A^{pro} suggérant que la nature du résidu en P1' n'est déterminante que lorsque ce dernier est lié à d'autres résidus par son extrémité C-terminale.

2.3.3. Le résidu P1 et le site S1

Dans le site de clivage de la polyprotéine du RVH-2 par la protéase 2A, le résidu à la position P1 est une alanine. Des oligopeptides mimant la séquence du site et contenant une thréonine, une leucine, une phénylalanine ou une tyrosine à cette position semblent être clivés avec la même efficacité (Sommergruber, Ahorn et al. 1992). De plus, un oligopeptide extrait du site VP1-2A du RVH-2, mais présentant une méthionine en P1

est clivé avec une efficacité 5 fois supérieure par rapport au peptide d'origine. Des peptides avec une asparagine ou une glutamine en P1 ne sont en revanche pas clivés (Sommergruber, Ahorn et al. 1992).

Selon le modèle de Petersen *et al.*, la poche S1 de la protéase 2A du RVH-2 interagissant avec le résidu P1, est principalement tapissée par la chaîne latérale de la Cys101 (Petersen, Cherney et al. 1999). Cette poche est étroite et permet une fixation optimale d'acides aminés aux chaînes latérales longues et flexibles comme la méthionine. De plus, le fond de la poche est globalement chargé négativement du fait de la présence de la chaîne latérale de la Glu102 ce qui empêche la fixation de résidus de même charge comme Glu ou Asp. Les résidus équivalents à la Cys101 et au Glu102 sont Ala104 et Glu105 pour la HRV14 2A^{pro}, et Ala104 et Ser105 pour la PV 2A^{pro} (Petersen, Cherney et al. 1999).

2.3.4. Le résidu P2 et le site S2

Le séquençage de la région VP1-P2A de 96 sérotypes différents de RVH montre que la position P2 est majoritairement occupée par une thréonine ou une asparagine (**Figure 27**). Petersen *et al.*, ont suggéré que la Tyr85 de la 2A^{pro} du RVH-2 interagit avec le résidu P2 du substrat en particulier lorsqu'il s'agit d'une thréonine (Petersen, Cherney et al. 1999). Ils proposent un modèle selon lequel la Thr à la position P2 forme une liaison hydrogène avec la Ser83 de la protéase. La Ser83 n'est pas un résidu conservé parmi les protéases 2A mais tous les résidus à cette position ou à une position équivalente sont « capables » de former une liaison hydrogène. Il est également intéressant de noter que des peptides contenant une Thr en P2 sont digérés 5 fois plus rapidement par la protéase que ceux ayant une serine à cette position alors que la présence d'une valine empêche tout clivage (Sommergruber, Ahorn et al. 1992).

2.3.5. Le résidu P4 et le site S4

Enfin, le site S4 qui se présente sous la forme d'une étroite poche hydrophobe favorise très vraisemblablement la présence de chaînes latérales hydrophobes de résidus tels que la leucine ou l'isoleucine. (hellen C. & Wimmer 1995).

La **figure 28** résume les spécificités de clivage de la protéase 2A du rhinovirus humain.

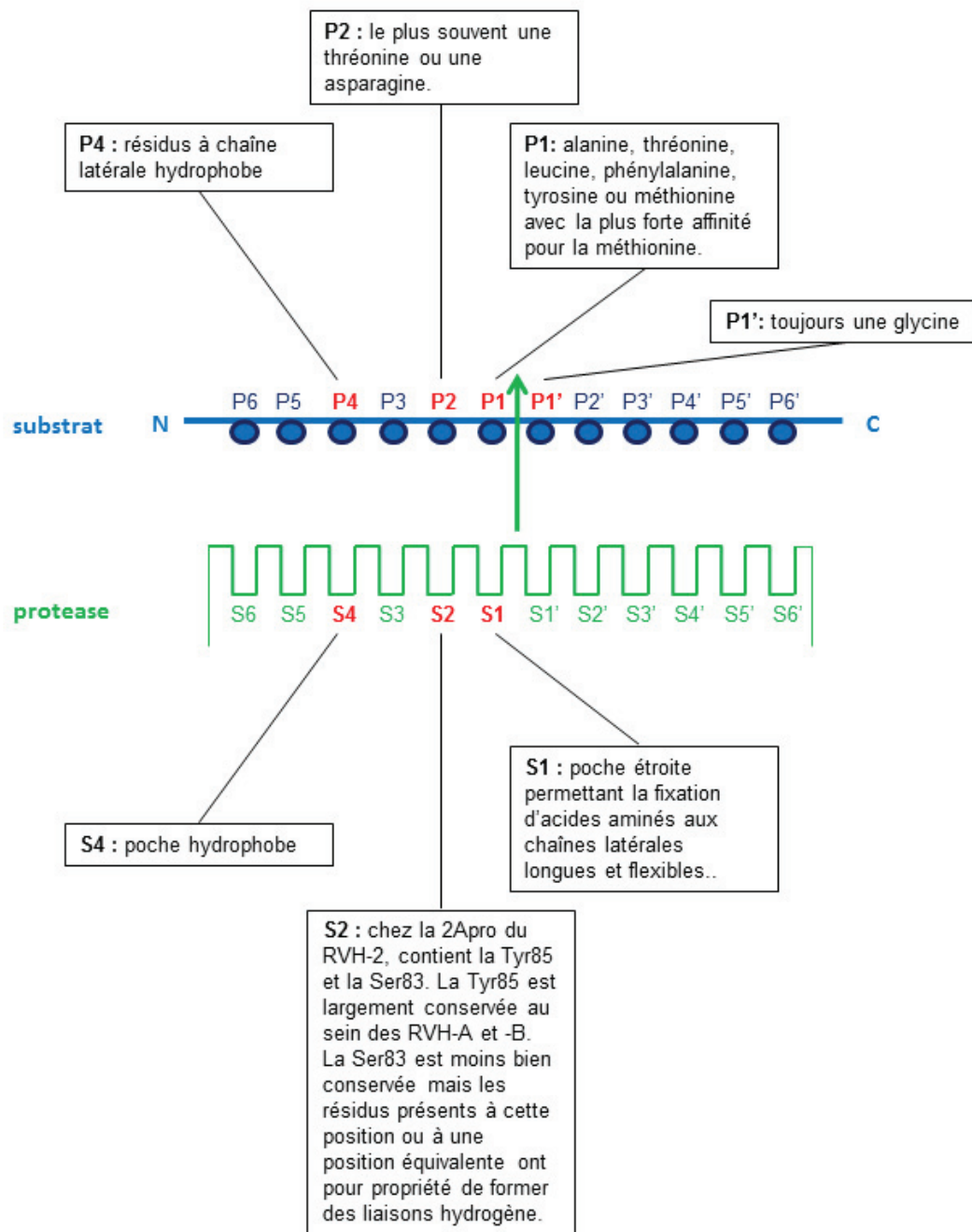


Figure 28. Schéma récapitulatif des spécificités de clivage de la 2A^{pro} du RVH.

2.4. Inhibiteurs de la protéase 2A du RVH

2.4.1. Les inhibiteurs peptidiques de la 2A^{pro}

Les inhibiteurs peptidiques de la protéase 2A peuvent être classés en deux groupes : (i) les peptides dérivés de sites de clivage de substrats naturels de l'enzyme viral et (ii) les peptides dérivés d'inhibiteurs connus de protéases cellulaires.

2.4.1.1. Les inhibiteurs peptidiques dérivés des sites de clivage de la protéase 2A

Plusieurs études ont décrit les spécificités de clivage de la 2A^{pro} en se basant sur l'identification et la caractérisation des sites de coupure de plusieurs cibles de l'enzyme viral (Skern, Sommergruber et al. 1991; Sommergruber, Ahorn et al. 1992; Hellen C. & Wimmer 1995; Wang, Sommergruber et al. 1997; Wang, Johnson et al. 1998; Badorff, Berkely et al. 2000; Badorff, Fichtlscherer et al. 2002; Sousa, Schmid et al. 2006). Des travaux ont décrit aussi l'utilisation de peptides dérivés des sites de clivage de la 2A^{pro} pour inhiber l'activité de l'enzyme. Ainsi, Badorff et al (2000 et 2002) ont mis au point les peptides suivants : **z.LSTT.fmk**, **z.LSTL.fmk** et **LSTC-DNIC** (z est un groupement benzyloxycarbonyl, fmk un groupement fluorométhylcétone et DNIC désigne le dinitrosyl iron complex). Ces derniers étaient dérivés du demi-site gauche du site de coupure de la dystrophine par la protéase 2A du Cocksackievirus B3 et inhibaient la 2A^{pro} avec une constante d'inhibition de 550 nM, 1050 nM et 510 nM respectivement. En 1999, Ventoso *et al* ont démontré que la séquence consensus du demi-site gauche du site de coupure reconnue par la 2A^{pro} du poliovirus était du type P4-Leu-X-Thr-Z-P1 où X est un résidu quelconque et Z un résidu hydrophobe (Ventoso, Barco et al. 1999). Des peptides dérivés de cette séquence ont été utilisés par la suite pour inhiber l'enzyme viral.

2.4.1.2. Les inhibiteurs peptidiques dérivés d'inhibiteurs connus de protéases cellulaires

L'inhibiteur de caspases **zVAD.fmk** (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone) est capable d'inhiber également l'activité de la protéase 2A du Rhinovirus *in vitro* et d'empêcher la réplication du virus en culture cellulaire (Deszcz, Seipelt et al. 2004). Il a été proposé que la forme méthyl ester du zVAD.fmk agit directement sur la protéase virale alors que la forme déméthylée du composé générée sous l'action des estérases intracellulaires cible préférentiellement les caspases. La spécificité du zVAD.fmk vis-à-vis de la 2A^{pro} a pu alors être sensiblement améliorée en remplaçant l'aspartate méthylé en position P1 de l'inhibiteur par une méthionine pour donner le **zVAM.fmk** [benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Met-fluoromethylketone] (Deszcz, Cencic et al. 2006). Ce changement avait été dicté principalement pour les raisons suivantes : (i) la méthionine qui n'est pas sensible à l'action des estérases fait que le zVAM.fmk perd toute propriété anti-caspases *in vivo*, (ii) il avait été montré par ailleurs que le remplacement de l'alanine P1 par une méthionine dans l'oligopeptide TRPIITTA-GPSDMYV site de coupure naturel de la 2A^{pro} du RVH-2, favorise considérablement l'hydrolyse de la liaison peptique P1-P1' (Sommergruber, Ahorn et al. 1992), (iii) enfin, de par sa présence, la méthionine qui constitue un aminoacide de nature hydrophobe renforce le passage de l'inhibiteur à travers la membrane plasmique. Si le zVAM.fmk s'est avéré capable d'inhiber à des doses variables (de 100 à 200 µM) la réplication *in vitro* de plusieurs sérotypes du rhinovirus appartenant soit au groupe A (RVH-2 et RVH-16) soit au groupe B (RVH-14), l'effet inhibiteur de ce composé sur la coupure du facteur eIF-4G ou celle de la polyprotéine virale était cependant très variable selon la 2A^{pro} étudiée.

L'inhibiteur de la caspase 8, **z.IETD.fmk**, est également un inhibiteur de la protéase 2A du RVH-2 et du CVB4 (IC₅₀ de 7,7 µM) (Deszcz, Seipelt et al. 2004).

L'élastase est un enzyme clivant l'élastine, un composant de la matrice extracellulaire. Son activité peut être inhibée par le **MPCMK** (methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhylcétone). Le MPCMK inhibe également l'activité de la 2A^{pro} du RVH-14, du PV-1 et du PV-3 *in vitro* suggérant que le repliement de la poche de fixation au substrat de la 2A^{pro} est proche de celui de l'élastase (Molla et al. 1993). Le groupement chlorométhylcétone du MPCMK forme une liaison covalente avec la cystéine catalytique de l'enzyme viral.

Nom de l'inhibiteur	Constante d'inhibition	2A ^{pro} testée	référence
ARGKLQTF	1,6 mM	PV	Ventoso et al., 1999
RGFMLSTL	0,6 mM	PV	Ventoso et al., 1999
z.LSTT.fmk	550 nM	CVB3	Badorff et al., 2000
z.LSTL.fmk	1050 nM	CVB3	Badorff et al., 2000
LSTC-DNIC	510 nM	CVB3	Badorff et al., 2002
z.IETD.fmk	7,7 µM	RVH-2; CVB4	Deszcz et al., 2004
z.VAD.fmk	5,6 µM	RVH-2; CVB4	Deszcz et al., 2004
z.VAM.fmk	-	RVH-2, RVH-14	Deszcz et al., 2006
MPCMK	20 µM	RVH-14, PV-1, PV-3	Molla et al., 1993
Calpain inhibitor 1	28 µM	PV	Molla et al., 1993
antipain	23 µM	PV	Molla et al., 1993

Tableau 6. Récapitulatif des inhibiteurs peptidiques de la 2A^{pro}.

Le **calpain inhibitor 1** (N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal, Ac-LLnL-CHO) est un peptide inhibiteur de la protéase à cystéine calpaine (activité de type papaïne). Il inhibe l'activité de clivage de la protéase 2A du poliovirus avec une IC₅₀ de 28 μ M (Molla et al. 1993).

L'**antipain** ou (S)-1-Carboxy-2-Phenylethyl]-Carbamoyl-L-Arg-L-Val-Argininal-HCL-2H₂O est un inhibiteur de la papaïne qui inhibe également la 2A^{pro} du PV (Molla et al. 1993). L'ensemble des inhibiteurs peptidiques de la 2A^{pro} est récapitulé dans le **tableau 6**.

2.4.2. Les inhibiteurs non peptidiques de la 2A^{pro}

L'**élastatinal** est un composé bloquant l'activité de l'élastase et agissant également sur la 2A^{pro} du PV et du RVH-14 avec une constante d'inhibition de 4 μ M (Molla et al. 1993).

Les agents alkylants tels que l'**iodoacétamide** et le **N-ethylmaleimide** inhibent l'activité de la 2A^{pro} en ciblant le site thiol de la cystéine catalytique (Konig and Rosenwirth 1988; Yu and Lloyd 1991).

Les **homophthalimides** constituent une famille de composés identifiés et caractérisés par la firme pharmaceutique Eli Lilly. Ils inhibent à la fois l'activité d'hydrolyse de la 2A^{pro} du RVH-2 et du RVH-14 et celle de la 3C^{pro} du RVH-14. Leurs constantes d'inhibition varient entre 4 μ M et 200 μ M selon le composé évalué et la 2A^{pro} testée (Wang, Johnson et al. 1998).

3. Objectifs

Comme décrit précédemment, le rhinovirus humain est la première cause virale d'infections des voies respiratoires et cela à travers toutes les classes d'âge, du nouveau-né au patient très âgé (Rotbart and Hayden, 2000). La présentation clinique du RVH ne se limite pas au simple rhume puisque ce virus est également associé aux otites moyennes aiguës chez l'enfant et aux sinusites chez l'adulte (Pitkaranta, Arruda et al. 1997). De plus, il peut être la cause de complications graves chez les sujets à risque tels

que les patients asthmatiques ou ceux souffrant d'immunodéficience (Nicholson, Kent et al. 1993). Aucun traitement spécifique contre le rhinovirus humain n'est disponible actuellement et aucun vaccin n'existe pour prévenir cette infection puisqu'une centaine de sérotypes différents du RVH ont été caractérisés. Le traitement de la maladie vise essentiellement à en soulager les symptômes. Différentes approches chimiothérapeutiques tentent de mieux combattre le RVH. Il s'agit principalement : (i) d'inhiber l'étape de déshabillage du virus par fixation de différents ligands au niveau de la capside (Arruda E. 1995), (ii) d'empêcher l'attachement du virus sur son récepteur ICAM-1 ou LDLR (Turner, 1997) et (iii) d'inhiber l'activité des protéases virales. Aucune de ces stratégies n'a abouti à la mise sur le marché d'un traitement efficace contre le RVH.

Dans ce contexte de vide thérapeutique, nous avons recherché de nouvelles molécules inhibitrices de la réplication des entérovirus. Plus particulièrement, nous avons ciblé la protéase 2A du RVH qui joue un rôle clé au cours du cycle d'infection viral. Nous avons mis au point un protocole de recherche de partenaires spécifiques de cet enzyme basé sur le test du double hybride chez la levure. Ce crible a permis d'identifier dix polypeptides présentant tous un motif séquentiel commun à leur extrémité C-terminale du type L-X-L-X-T/N- ϕ où X désigne un acide aminé quelconque et ϕ un acide aminé hydrophobe. Parmi eux, le peptide LVLQTM qui correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine cellulaire RBM6 Δ 6 (RNA Binding Motif), présente la plus forte affinité pour la 2A^{pro} du RVH-2. Ce peptide a servi de base pour mettre au point un inhibiteur compétitif et irréversible de la 2A^{pro}, du type z.LVLQTM.fmk. (benzyloxycarbonyl.LVLQTM. fluorométhylcétone). Ce peptide inhibe la réplication du RVH-2 dans les cellules A549 et *in vivo* chez la souris (**Publication 1 : *Inhibition de la réplication du rhinovirus humain par un nouveau pseudo-substrat de la protéase virale 2A***).

L'EV-71, un autre membre du genre entérovirus, est responsable du syndrome pied-main-bouche et est devenu agressif dans les pays asiatiques où il provoque des épidémies de grande ampleur (Kairis, Sauter et al. 2009). Ainsi, en 1998, une épidémie à HEV-71 a touché plus de 90 000 enfants à Taiwan (Kerekatte, Keiper et al. 1999; Liu, Tseng et al. 2000). Plus récemment, une épidémie de syndrome pied-main-bouche a touché près de 5000 nourrissons et jeunes enfants dans la ville de Fuyang (province de

l'Anhui) en Chine en 2008. Nous avons montré que le peptide z.LVLQTM.fmk inhibe également la 2A^{pro} de l'entérovirus 71 (EV-71) et la réplication du virus élargissant son spectre d'action à d'autres entérovirus (**Publication 2 : *Inhiber la réplication de l'entérovirus 71 humain en ciblant la protéase virale 2A***).

Ces travaux ont permis de découvrir et caractériser des peptides inhibiteurs des infections à rhinovirus pouvant servir de base pour la mise au point d'un traitement efficace contre ces virus et d'autres membres de la même famille (entérovirus 71, poliovirus, coxsackievirus).

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Identification de partenaires de la protéase 2A du RVH-2 par la technique du double-hybride chez la levure

La protéine de fusion LexA-RVH-2 2A^{pro} a été utilisée comme appât pour cribler une banque d'ADN complémentaires (ADNc) de placenta humain. Pour cela, la séquence codant pour la 2A^{pro} du RVH-2 (GenBank X02316) a été synthétisée et clonée dans le vecteur pB27 en fusion avec LexA. Cette protéine de fusion a été utilisée comme appât pour cribler une banque d'ADNc de placenta humain insérés dans le vecteur P6 (Vojtek and Hollenberg 1995).

Le criblage à haut débit de 53,1 millions de clones réalisé par la société de service Hybrygenics selon l'approche décrite par Fromont-Racine et *al.* a permis de sélectionner 51 partenaires potentiels de la 2A^{pro} du RVH-2 (Fromont-Racine, Rain et al. 1997). L'ADNc correspondant à chacun d'eux a été amplifié par PCR et séquencé aux extrémités 5' et 3' pour être identifié dans la base de données GenBank (NCBI). Un indice de confiance PBS (Predicted Biological Score) a été attribué à chacune des interactions identifiées (Formstecher, Aresta et al. 2005). Cet indice reflète la réalité biologique des interactions détectées par cette technique (Wojcik, Boneca et al. 2002; Fabian, Brain et al. 2011).

2. Expression de protéines recombinantes dans un système bactérien et purification de protéines

Les séquences codant pour les 2A^{pro} du RVH-2, de l'EV-6 et de l'EV-71 (respectivement GenBank X02316, AY302558 et AEF32490) ont été clonées dans le vecteur de surexpression pSCodon1.2 (Eurogentec) entre les sites de restriction *Nde*I et *Xho*I en fusion avec une étiquette (His)₆ ou StrepTag (WSHPQFEK) du côté C-terminal de la protéine. La séquence nucléotidique codant pour le motif LVLQTM a été clonée dans le vecteur pET-SUMO (Invitrogen), entre deux sites de restriction *Bsa*I, en phase avec l'extrémité C-terminale de la protéine SUMO. L'étiquette Streptag a été ajoutée du

côté N-terminal de la protéine fusion SUMO-LVLQTM. Cette construction a été transférée dans le vecteur pSCodon1.2. De la même manière, un plasmide pSCodon1.2[Streptag-SUMO] a été construit pour servir de contrôle.

Ces plasmides ont été utilisés pour transformer la souche *Escherichia coli* B de type SE1 [F-, CmR, ompT, lon, hsdSB(rB-, mB-), gal, dcm, DE3 (lacI, T7polymerase sous le contrôle du promoteur PlacUV5), ccdB+] et produire les protéines exprimées par chacune des constructions. Pour cela, les bactéries ont été mises en culture dans un milieu d'auto-induction ZYP-5052 (1 % NZ amine AS (Sigma), 0,5 % extrait de levures, 1 mM MgSO₄, 0,5 M (NH₄)₂SO₄, 1 M KH₂PO₄, 1 M Na₂HPO₄, 50 µM ZnSO₄, 100 µg.mL⁻¹ carbénicilline, 0,05 % glucose, 0,5 % glycérol et 0,2 % lactose) à 37°C pendant 5-6 heures sous agitation (Toyoda, Nicklin et al. 1986). Elles ont ensuite été transférées à 20°C pendant 16 à 18 heures.

Les cellules ont été lysées avec un mélange de détergents (BugBuster, Novagen) et centrifugées à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été prélevés et les protéines d'intérêt ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur résine de nickel (HIS-select nickel Sigma) ou de Strep-Tactin (StrepTrap HP GE Healthcare). Chacune des protéines recombinantes a été dialysée contre le tampon D (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, DTT 4 mM) et concentrée par filtration tangentielle sur colonne Vivaspinn (Sartorius Stedim Biotech).

3. Reconstitution d'un site de clivage complet de la 2A^{pro} à partir des hexapeptides identifiés en double hybride

Les séquences nucléotidiques codant pour les sites hybrides de type LXLX(T/N) φ-GPSDM sélectionnés en double hybride (où X et φ représentent les aminoacides aux mêmes positions dans chacun des dix peptides identifiés et les positions P1'-P5' correspondant à la séquence GPSDM trouvée dans le site de clivage VP1-2A de la polyprotéine du RVH-A2 par la 2A^{pro}) ont été insérées entre les sites *NheI* et *BglII* d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide reliant les domaines N- et C-terminaux d'une luciférase recombinante dans le vecteur pGloSensorTM-10F (Promega).

Les protéines correspondantes ont été synthétisées pendant 2 h à 25°C dans un système de transcription/traduction *in vitro* en présence de [³⁵S]-méthionine (TNT SP6 High Yield Wheat Germ Master Mix, Promega).

Les luciférases radioactives synthétisées précédemment (13 µL) ont été incubées pendant 45 min à 30°C en présence de 2 µg de 2A^{pro} pure et 13 µL de tampon de réaction 2X (100 mM HEPES/NaOH, pH 7.9, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT pour les 2A^{pro} du RVH-2 et de l'EV-71; 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl et 10 mM DTT pour la 2A^{pro} de l'EV-6). Des aliquots du mélange de réaction ont été prélevés à 0 min, 15 min, 30 min et 45 min après le début de l'incubation. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et analysées par fluorographie. La luminescence a été mesurée après dilution de 20 fois de chaque milieu réactionnel dans l'eau. 100 µl de chaque dilution ont été déposés dans un puits d'une plaque 96 puits blanche à fond plat. Puis 100 µl de réactif Bright-Glo (Promega) ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a ensuite été incubée pendant 2 à 5 min à température ambiante et la luminescence a été mesurée en utilisant le luminomètre GloMax. Chaque réaction a été réalisée en triplicat.

4. Expériences de type pull-down

Dans les expériences de type histidine pull-down, les séquences codant pour les fragments RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ et RBM6₂₇₄₋₆₆₀ ont été insérées entre les sites de restriction *Nco*I et *Xho*I du vecteur d'expression protéique pET-28 (Novagen). Ces constructions ont servi de matrice pour synthétiser les protéines correspondantes dans un système de transcription/traduction couplées *in vitro* en présence de [³⁵S]-méthionine (TNT-coupled reticulocyte lysate system, Promega). Un volume de 50 µl de milieu réactionnel a été incubé pendant 1 h avec de la 2A^{pro}-(His)₆ du RVH-2 fixée sur des billes d'agarose magnétiques recouvertes de nickel (Qiagen) dans un volume total de 1 ml de tampon d'incubation (25 mM phosphate de sodium, pH 8 ; 500 mM NaCl ; 20 mM imidazole ; 0,005 % Tween 20). La résine a été récupérée à l'aide d'un aimant, lavée deux fois avec 500 µl de tampon d'incubation, re-suspendue dans 40 µl de tampon de charge laemmli (2X) puis chauffée à 95°C pendant 5 min. Les protéines ont été séparées sur un gel

SDS-PAGE 12 % et analysées par fluorographie ou western blot (anticorps polyclonal anti-histidine, Cell Signaling).

Dans les expériences de type StrepTag pull-down, les lysats bactériens contenant les protéines StrepTag-SUMO, StrepTag-SUMO-LVLQTM et RVH-2 2A^{pro}-(His)₆ ont été incubés deux à deux (StrepTag-SUMO-LVLQTM et RVH-2 2A^{pro}-(His)₆ ou StrepTag-SUMO et RVH-2 2A^{pro}-(His)₆) et soumis à une chromatographie d'affinité sur billes magnétiques recouvertes de Strep-Tactin (Qiagen) pendant une heure. Les complexes protéiques fixés aux billes après plusieurs lavages ont été séparés sur gel d'acrylamide SDS-PAGE 15 % et colorés par du Coomassie Brilliant Blue R250. Les protéines étiquetées (His)₆ ont été visualisées par western blot en utilisant un anticorps polyclonal anti-histidine (Cell Signaling).

5. Clivage du substrat TRPIITTA-pNA par la 2A^{pro} du RVH-2

L'hydrolyse du substrat colorimétrique TRPIITTA-p-nitroanilide (TRPIITTA-pNA) spécifique de la 2A^{pro} du RVH-2 a été mesurée *in vitro* en présence de la protéine Streptag-SUMO fusionnée ou non au peptide LVLQTM. Le clivage de ce peptide entre l'alanine à la position P1 et le pNA libère la p-nitroaniline de couleur jaune dont l'absorbance a été mesurée à 405 nm (Wang, Sommergruber et al. 1997).

Le test d'activité a été effectué à 25°C dans un volume final de 1 mL avec un tampon contenant 100 mM de NaCl, 50 mM d'HEPES/NaOH pH 8, 1 mM d'EDTA et 10 mM de DTT. Différentes quantités de protéines recombinantes StrepTag-SUMO-LVLQTM ou StrepTag-SUMO ont été pré-incubées avec 0,2 µM de 2A^{pro} du RVH-2 pendant 5 min avant de rajouter 25 µM de substrat pour initier la réaction. Les mesures d'absorbance ont été effectuées en continue à 405 nm pendant 10 min pour déterminer la vitesse initiale de chaque réaction. Le pourcentage d'inhibition pour une concentration donnée de peptide StrepTag-SUMO-LVLQTM a été calculé en faisant le rapport des vitesses initiales de réaction déterminées en présence et en l'absence de peptide.

6. Culture cellulaire

Les cellules A549 (cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome pulmonaire) et HeLa (cellules épithéliales humaines issues d'un carcinome du col de l'utérus) ont été maintenues en culture dans du milieu DMEM (milieu modifié Dulbecco, Lonza) contenant 0,1 % de glucose et complémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, dans un incubateur à 37°C et dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂. A 80% de confluence, les cellules ont été détachées du support par traitement à la trypsine-EDTA et réensemencées dans une fiole de culture contenant du milieu frais.

Les cellules MRC5 ont été maintenues en culture dans du milieu EMEM 7 % sérum de veau fœtal non décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine.

7. Transfection transitoire de plasmides et extraction des protéines totales

La veille de la transfection, les cellules A549 ont étéensemencées dans des boîtes de culture 6 cm (Corning) pour atteindre 80 % de confluence au moment de la transfection. Les vecteurs pCINeo[2xStreptag-RBM6Δ₆₂₇₄₋₅₂₀] et pCINeo[2xStreptag-RBM6Δ₆₂₇₄₋₅₁₄] ont été transfectés en utilisant les réactifs NanoJuice (Novagen) selon les recommandations du fabricant.

Les cellules ainsi transfectées ont été lysées 48 h après transfection en présence de la solution de lyse Mammalian Protein Extraction Reagent (Roche) supplémentée avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete protease inhibitor Cocktail, Roche). Les protéines totales ont été récupérées après centrifugation du lysat à 15 000 g pendant 15 min à 4°C. Le dosage protéique a été réalisé en utilisant la solution The Better Bradford Assay Kit (Pierce).

8. Western blot

Les protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide. Après migration à 90 V pendant environ 2 h, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (Biorad) pendant 1h30 à 400 mA. Les membranes ont ensuite été saturées avec une solution de TBS-Tween (0,1 %) et lait en poudre 5 % pendant 1 h à température ambiante puis incubées sur la nuit à 4°C avec : (i) un anticorps polyclonal dirigé contre l'étiquette (His)₆ (Cell Signaling, référence 2365) ou (ii) un sérum de lapin reconnaissant eIF4G (Ohlmann, Rau et al. 1996). Le lendemain, les membranes ont été lavées deux fois pendant 5 min avec du TBS-Tween puis incubées avec un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase (GE Healthcare). Après 4 lavages de 15 min avec du TBS-tween, les anticorps secondaires ont été révélés avec le kit Pierce ECL Detection et des films photographiques du type Amersham hyperfilm, GE Healthcare.

9. Transcription *in vitro* et transfection d'ARN

Des plasmides pGlobin-Renilla dans lesquels ont été insérées les séquences codant pour la 2A^{pro} du RVH-2, du RVH-14, de l'EV-6 ou de l'EV-71 ont été linéarisés par *EcoRI* (Soto Rifo, Ricci et al. 2007). Ces constructions ont été utilisées pour transcrire *in vitro* des ARN coiffés codant pour chacune de ces protéases selon le protocole décrit par Prevot et al (Prevot, Decimo et al. 2003). Les ARN ainsi synthétisés ont ensuite été traités à la DNase RQ1 (Promega) pendant 45 min à 37°C, précipités à l'acétate d'ammonium et repris dans de l'eau dépourvue de RNase et DNase. L'intégrité des ARN néosynthétisés a été vérifiée sur gel d'agarose non dénaturant et leur concentration a été mesurée par spectrophotométrie en utilisant un Nanodrop (Nanodrop Technologies).

Deux jours avant la transfection, les cellules A549 ont été ensemencées dans des plaques 48 puits à raison de 75 000 cellules par puits pour atteindre environ 180 000 cellules par puits au moment de la transfection. Les ARN ont été transfectés en utilisant le kit TransIT (Mirus Bio). Pour mesurer les effets de la 2A^{pro} sur l'intégrité du facteur d'initiation de la traduction eIF4G, les cellules A549 ont été transfectées (i) pendant 2 h avec 100 ng par puits d'un ARNm coiffé et polyadénylé codant pour la 2A^{pro} du RVH-A2, du RVH-14, de l'EV-6, de l'EV-71 ou la protéine GFP (contrôle), et (ii) pendant 3

h avec 50 ng par puits d'un ARNm rapporteur codant pour la luciférase Renilla (R-Luc) et contenant soit la séquence 5'UTR du gène de la β -globine (ARNm coiffé, Cap-R-Luc) soit la séquence IRES de l'EMCV (encephalomyocarditis virus, ARNm non coiffé, IRES-R-Luc). L'activité luciférase a été mesurée en utilisant le kit *Renilla* Luciferase Assay System de Promega et le luminomètre Veritas microplate (Turner BioSystems).

10. Virus, infection des cellules et titrage

Les virus RVH-2 (Genbank X02316), RVH-14 (GenBank K02121) et EV-71 (GenBank AEF32490) ont été fournis par le centre national de référence des entérovirus (Lyon, France). Les cellules A549 et HeLa ont été infectées respectivement par les RVH et l'EV-71 avec une multiplicité d'infection de 1 dans du milieu DMEM contenant 2 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine. Elles ont ensuite été incubées à 34°C, dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂.

Les surnageants des cellules infectées ont été titrés sur des cellules MRC5. Cinq jours avant inoculation avec les virus, les cellules MRC5 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits. Le jour de l'infection, huit dilutions de raison 10, de 10⁻¹ à 10⁻⁸ ont été réalisées pour chaque échantillon de façon à inoculer 100 μ L de chaque dilution sur 6 puits par plaque 24 puits. Le milieu de survie des cellules a été remplacé par le milieu d'infection EMEM 2 % sérum de veau fœtal décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 μ g/mL de streptomycine, avant distribution des suspensions virales sur plaque (1,4 mL par puits). Puis 100 μ L de chaque dilution de virus ont été distribués sur 6 cupules de plaques 24 puits. Plusieurs témoins sans virus ont également été réalisés. Les plaques ont été incubées à 34°C pendant 5 jours et la DICT50 (dose infectieuse cytopathogène) a été calculée selon la méthode de Reed et Muench (Reed L.J. 1938).

11. Test de viabilité des cellules A549 en présence du peptide z.LVLQTM.fmk

La viabilité des cellules A549 en présence de différentes concentrations du peptide z.LVLQTM.fmk a été déterminée par un test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

La veille du traitement avec le peptide inhibiteur, les cellules A549 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits pour atteindre 90 % de confluence au moment du traitement. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec du DMSO 1 % ou différentes concentrations de z.LVLQTM.fmk pendant 24 h. Les cellules ainsi traitées ont alors été mises en présence de 30 µl de MTT (5 mg/ml, Sigma) pendant 3 h à 37°C. Après élimination du milieu de culture cellulaire, 150 µl de DMSO ont été ajoutés dans chaque puits et l'absorbance à 540 nm a été mesurée. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé par rapport aux cellules traitées au DMSO. Cette expérience a été répétée 3 fois.

12. Infection et traitement des souris balb/c

Les effets du peptide z.LVLQTM.fmk sur la réplication du RVH-2 ont été évalués *in vivo* chez la souris. L'ensemble des expérimentations animales ont été réalisées en suivant les recommandations de la Commission Nationale pour l'Expérimentation Animale (CNEA) et du Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (CNREEA). Le protocole expérimental décrit ci-dessous a été approuvé par le comité d'expérimentations animales de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (permis n°BH2008-13).

Le jour de l'infection, des souris femelles Balb/c âgées de 6 semaines (Charles River) ont été anesthésiées avec de la kétamine (42,5 mg/kg de masse corporelle). Elles ont été alors infectées par voie intranasale avec 10⁵ pfu (plaque forming units) de RVH-2 contenu dans 25 µL de milieu EMEM 2% serum puis traitées par voie intranasale avec 20 µM, 200 µM ou 500 µM des peptides z.LVLQTM.fmk ou z.FA.fmk contenus dans 25 µL de milieu EMEM 1 % DMSO. Les souris ont été sacrifiées à différents temps

post infection et les poumons ont été prélevés puis broyés dans 500 μ L de milieu EMEM. Les souris sacrifiées 120 h post-infection ont reçu une deuxième injection de peptide 48h post-infection. Les lysats ainsi obtenus ont été centrifugés à 15 000 g pendant 15 min à 4°C et les surnageants ont été titrés sur des cellules MRC5.

Résultats

Résultats

Inhibition de la réplication du rhinovirus humain par un nouveau pseudo-substrat de la protéase virale 2A

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Sébastien Violot de l'équipe biocristallographie et biologie structurale des cibles thérapeutiques CNRS UMR 5086, Didier Décimo et Théophile Ohlmann de l'unité de virologie humaine INSERM U758 et Béatrice Riteau de l'équipe VirPath EA 4610.

Parce qu'aucun antiviral n'est actuellement disponible pour lutter contre le RVH, nous avons entrepris la recherche de nouvelles molécules inhibitrices de la réplication des rhinovirus humains. En particulier, la protéase virale 2A, qui joue un rôle essentiel au cours du cycle d'infection, a été choisie comme cible pour développer de nouveaux inhibiteurs.

Nous avons mis au point un protocole de recherche de partenaires spécifiques de cet enzyme basé sur le test du double hybride chez la levure. Dans ce test réalisé par la société Hybrigenics, la 2A^{pro} du rhinovirus humain de type 2 (RVH-A2) a servi de protéine appât pour cribler une banque d'ADNc de placenta humain. Le criblage à haut débit de 53,1 millions de clones a permis de sélectionner 10 partenaires potentiels différents de la 2A^{pro} qui présentaient tous à leur extrémité C-terminale un motif hexapeptidique du type LXLX(T/N)φ où X désigne un acide aminé quelconque et φ un acide aminé hydrophobe, ce motif mimant en partie le site de clivage présent dans plusieurs protéine-substrats naturels de la 2A^{pro} (**Figure 1**).

La reconnaissance du motif LXLX(T/N) par le centre actif de la protéase virale a ensuite été confirmée dans un système utilisant comme substrat potentiel de la 2A une

luciférase recombinante contenant le peptide hybride LXLX(T/N) ϕ -GPSDM (les positions P6-P1 correspondant à chacun des dix peptides sélectionnés précédemment en double hybride et les positions P1'-P5' correspondant à la séquence GPSDM trouvée dans le site de clivage VP1-P2A (PIITTA-GPSDM) de la 2A^{pro} de la polyprotéine du RVH-A2). Les différentes luciférases à tester ont été synthétisées dans un système de transcription-traduction couplées *in vitro* en présence de ³⁵S-Met puis incubées en présence de la 2A^{pro} du RVH-2. Leur clivage spécifique par la protéase a été caractérisé dans chaque cas soit après séparation des fragments radioactifs générés par SDS-PAGE et autoradiographie, soit par leur capacité à convertir la luciférine en lumière. Les résultats obtenus et présentés sur la **Figure 2A** montrent que tous les peptides identifiés en double hybride conduisaient au clivage (**Figure 2B**) et donc à l'activation de la luciférase (**Figure 2A**) après coupure par la 2A^{pro}, la plus forte émission de lumière étant obtenue en présence du site hybride LVLQTM-GPSDM. Aucune activité n'a été détectée lorsque la 2A^{pro} a été mise en présence de la luciférase contenant la séquence ENLYFQ-S qui correspond au site de clivage de la TEV protéase. Ces résultats démontraient ainsi que les polypeptides identifiés après criblage en double hybride à haut débit se comportaient comme de véritables analogues de substrats de la 2A^{pro} du RVH-A2 et que le peptide LVLQTM (correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine cellulaire RBM6Δ6) représentait la molécule « hit » de cette étude.

Le peptide LVLQTM a donc été choisi par la suite pour valider *in vitro*, dans des expériences de type «pull-down», les interactions identifiées précédemment. En particulier, nous avons produit dans un système bactérien, les protéines recombinantes RVH-A2 2A^{pro}-(His)₆, StrepTag-SUMO et StrepTag-SUMO-LVLQTM, les avons mélangées deux à deux (StrepTag-SUMO-LVLQTM et RVH-A2 2A^{pro}-(His)₆ ou StrepTag-SUMO et RVH-A2 2A^{pro}-(His)₆) et les avons soumises à une chromatographie d'affinité sur billes magnétiques recouvertes de Strep-Tactin. Les complexes protéiques fixés aux billes ont été séparés sur gel d'acrylamide SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie (**Figure 3C**). De cette façon, il a été montré que RVH-A2 2A^{pro}-(His)₆ co-élue avec StrepTag-SUMO-LVLQTM mais pas avec StrepTag-SUMO confirmant ainsi les résultats obtenus en double-hybride.

L'effet du peptide LVLQTM sur l'activité de la protéase 2A du RVH-A2 a ensuite été mesuré *in vitro* en utilisant le substrat colorimétrique TRPIITTA-p-nitroanilide (TRPIITTA-pNA). Ce substrat contenait les résidus P6-PIITTA-P1 du site de coupure VP1-2A^{pro} de la polyprotéine du rhinovirus A2. Le clivage de ce peptide entre l'alanine à la position P1 et le groupement pNA a libéré la p-nitroaniline de couleur jaune dont l'absorbance a été mesurée à 405 nm (Wang, Sommergruber et al. 1997). En présence de 25 µM de substrat et 25 µM de protéine StrepTag-SUMO-LVLQTM, la vitesse initiale de la réaction de clivage a été réduite de 70 % par rapport au témoin sans peptide (**Figure 3D**). La protéine StrepTag-SUMO n'a pas eu d'effet significatif sur la réaction. Ces résultats indiquaient que le motif LVLQTM inhibait spécifiquement et de manière réversible l'activité de clivage de la 2A^{pro} du RVH-A2 *in vitro*.

Le pouvoir inhibiteur du peptide LVLQTM a ensuite été validé *in cellulo*, selon un protocole en trois étapes consistant à quantifier l'effet inhibiteur de LVLQTM sur le clivage du facteur d'initiation de la traduction eIF4G par la 2A^{pro}. Dans ce protocole, des cellules A549 ont été transfectées (i) pendant 24 h avec un plasmide exprimant le fragment RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ ou le fragment RBM6Δ6₂₇₄₋₅₁₄ (délété du motif LVLQTM) puis, (ii) pendant 2 h avec un ARNm coiffé et polyadénylé codant pour la 2A^{pro} du RVH-A2 ou la protéine GFP (contrôle), et enfin (iii) pendant 3 h avec un ARNm rapporteur codant pour la luciférase Renilla (R-Luc) et contenant soit la séquence 5'UTR du gène de la β-globine (ARNm coiffé, Cap-R-Luc) soit la séquence IRES de l'EMCV (encephalomyocarditis virus, ARNm non coiffé, IRES-R-Luc). Ce test s'appuyait sur le fait que dans les cellules eucaryotes, la distribution entre ARNm coiffés et non coiffés est largement en faveur des premiers cités dont l'initiation de la traduction dépend de l'intégrité du complexe eIF4G/eIF4E. En revanche, la traduction des ARN contenant un IRES peut se produire avec du facteur eIF4G protéolysé. Ainsi, la présence de protéines eIF4G intactes permet la traduction de tous les ARNm tandis que leur hydrolyse ne favorise que la traduction des ARNm non coiffés. Dans ce système, l'expression de la 2A^{pro} du RVH-2 en présence d'un vecteur contrôle pCI-neo a conduit au clivage de eIF4G (**Figure 4B, piste 2**), à l'inhibition de la traduction des ARNm coiffés et indirectement à l'augmentation de la traduction des ARN IRES comme mesurée par la diminution de l'activité Cap-R-Luc et l'augmentation de

l'activité du rapporteur IRES-R-Luc (**Figure 4A**). En présence de l'extrémité C-terminale de la protéine RBM6Δ6 (RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀), le clivage de eIF4G par la 2A^{pro} a été notablement réduit (**Figure 4B, piste 3**) et le niveau de traduction de Cap-R-Luc n'a été que très faiblement affecté (**Figure 4A**). De plus, l'expression de l'extrémité C-terminale de la protéine RBM6Δ6 délétée de la séquence LVLQTM (RBM6Δ6₂₇₄₋₅₁₄) n'a pas modifié l'activité de la 2A^{pro} du RVH-A2 montrant que le fragment RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ inhibait spécifiquement la 2A^{pro} via son motif LVLQTM.

Afin de mieux comprendre les interactions qui s'établissent entre le peptide inhibiteur et le site actif de la protéase 2A du RVH-A2, nous avons modélisé la fixation de LVLQTM dans la poche de liaison du substrat de la protéase. Ce modèle a été réalisé à partir de la structure 3D déjà connue de la 2A^{pro} du RVH-A2 et de celle du complexe entre la 3C^{pro} du virus FMDV (foot and mouth disease virus) et du peptide APAK-LLNFD (Petersen, Cherney et al. 1999; Zunszain, Knox et al. 2010). Dans ce modèle (**Figure 6**), la valine en position P5 (P5-Val) est essentiellement exposée au solvant (**Figure 6A**) et sa chaîne latérale est entourée des chaînes latérales polaires des résidus Gln81 et Asp125 de la protéase 2A. D'autre part, P4-Leu est logée dans une dépression apolaire définissant le début de la poche de liaison peptidique représentée par les chaînes latérales des résidus Tyr78, Ile80, Ile96 et Ala129 (**Figure 6A**). La chaîne latérale de P3-Gln pointe vers le solvant ce qui explique pourquoi il n'y avait pas de préférence marquée pour un résidu particulier à cette position. La chaîne latérale de P2-Thr établit deux liaisons hydrogène avec les résidus Ser83 et Tyr85. Enfin la chaîne latérale de P1-Met effectue trois liaisons hydrogènes avec la poche de liaison du substrat: deux avec le résidu Cys106 et une avec Tyr85 (**Figure 6A**). A la lumière de ce modèle, nous avons montré que la double mutation S83A/D125A entraîne une diminution, d'environ 20 fois, du taux initial d'hydrolyse du substrat TRPIITTA-pNA par le 2A^{pro} (données non présentées) confirmant que ces deux résidus jouent un rôle majeur dans l'interaction avec le peptide LVLQTM.

Ce peptide a servi de base pour mettre au point un inhibiteur compétitif et irréversible de la 2A^{pro}, du type z.LVLQTM.fmk (benzyloxycarbonyl.LVLQTM. fluorométhylcétone, **Figure 7A**). Les groupements fonctionnels que nous lui avons associés sont connus pour favoriser son passage à travers la membrane plasmique des

cellules humaines (groupement z) d'une part et pour former un lien covalent avec la cystéine du centre actif de la protéase 2A (groupement fmk) d'autre part. Ainsi modifié, z.LVLQTM.fmk inhibe complètement l'activité de la 2A^{pro} du RVH-2 avec une constante d'inhibition (Ki) de 0,3 μ M contre 10 μ M pour sa version non modifiée (**Figure 7B**). De plus, le peptide z.LVLQTM.fmk est également capable d'inhiber la 2A^{pro} du Rhinovirus A2, du Rhinovirus B14 et de l'Echovirus 6 (**Figure 7C**). Nous avons également testé l'effet inhibiteur du z.LVLQTM.fmk sur l'infection de cellules A549 par le RVH-A2 ou le RVH-B14 et avons démontré qu'il était capable de réduire de plus de 100 fois le pouvoir réplcatif de ces virus (**Figure 7D**).

L'effet inhibiteur du peptide z.LVLQTM.fmk sur la réplication du RVH-A2 a également été validé *in vivo* chez la souris. Des souris femelles Balb/c de 6 semaines ont été infectées par voie intranasale avec 10⁵ pfu de RVH-A2 contenu dans 25 μ L de milieu EMEM 2% sérum puis traitées par voie intranasale avec 20 μ M, 200 μ M ou 500 μ M de z.LVLQTM.fmk contenu dans 25 μ L de DMSO. Un contrôle DMSO seul a été réalisé. Les souris ont été sacrifiées 24 h, 48 h ou 120 h post-infection et la quantité de virus dans les poumons des souris infectées a été déterminée. Nous avons ainsi démontré que le titre viral diminue de près de 30 fois dans les poumons de souris traitées avec les doses les plus faibles de peptide (20 μ M) et ce dès 24 h post-infection (**Figure 8A**). De plus, cette inhibition était spécifique puisque comparé au peptide contrôle z.FA.fmk, l'effet inhibiteur du peptide z.LVLQTM.fmk était significatif 48 h après infection et traitement (**Figure 8B**). Nous avons également montré que le peptide z.LVLQTM.fmk inhibait de manière significative la réplication virale lorsque les souris étaient traitées 12 h post-infection puis sacrifiées 48 h après infection. De manière plus intéressante encore, cette inhibition semblait être plus efficace que lorsque le traitement était effectué au même moment que l'infection (**comparer les Figures 8A et 8C**).

En conclusion, le criblage en double-hybride chez la levure nous a permis d'identifier dix partenaires peptidiques de la protéase 2A du rhinovirus humain. Sur la base de l'analyse de leur séquence, nous avons postulé que ces peptides représentaient des pseudo-substrats de l'enzyme pouvant se lier à la protéase selon le modèle *clé-serrure*. La preuve directe de l'interaction a été fournie par le test de la luciférase GloTM qui a élu le peptide LVLQTM comme le meilleur candidat pour développer un inhibiteur

irréversible de la 2A^{pro} du RVH du type z.LVLQTM.fmk. Ainsi modifié, le composé z.LVLQTM.fmk était un inhibiteur efficace de l'activité de la protéase 2A du RVH-A2 (K_i de 0,3 µM), et inhibait spécifiquement la réplication du RVH-A2 *in vitro* dans les cellules A549, mais aussi *in vivo* dans les souris. Sur la base des données cristallographiques de la protéase 2A du RVH-A2, un modèle d'interaction a ensuite été proposé. De manière intéressante, la comparaison des séquences des 2A^{pro} des espèces RVH-A, -B et -C a révélé que les résidus qui, d'après notre modèle, sont impliqués dans l'interaction avec le peptide LVLQTM sont relativement bien conservés (**Figure 9**) élargissant le spectre d'action de cet inhibiteur à l'ensemble des protéases 2A des rhinovirus. Si LVLQTM semble agir contre tous les sérotypes de RVH, son utilisation à des fins thérapeutiques pourrait être étendue à d'autres entérovirus. En effet, la comparaison de la séquence des protéases 2A du poliovirus de type 1 et de l'enterovirus 71 avec celle du RVH-A2 ne révèle que des différences mineures (**Figure 10**). Par conséquent, le modèle permettait de prédire avec précision l'interaction du peptide LVLQTM avec un large spectre de protéases 2A entérovirales.

***Ex Vivo* and *In Vivo* Inhibition of Human Rhinovirus Replication by a New Pseudosubstrate of Viral 2A Protease**

Nisrine Falah, Sébastien Violot, Didier Décimo, Fatma Berri, Marie-Laure Foucault-Grunenwald, Théophile Ohlmann, Isabelle Schuffenecker, Florence Morfin, Bruno Lina, Béatrice Riteau and Jean-Claude Cortay
J. Virol. 2012, 86(2):691. DOI: 10.1128/JVI.05263-11.
Published Ahead of Print 9 November 2011.

Updated information and services can be found at:
<http://jvi.asm.org/content/86/2/691>

These include:

REFERENCES

This article cites 34 articles, 19 of which can be accessed free at: <http://jvi.asm.org/content/86/2/691#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://jvi.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Ex Vivo and In Vivo Inhibition of Human Rhinovirus Replication by a New Pseudosubstrate of Viral 2A Protease

Nisrine Falah,^a Sébastien Violot,^b Didier Décimo,^c Fatma Berri,^a Marie-Laure Foucault-Grunenwald,^a Théophile Ohlmann,^c Isabelle Schuffenecker,^d Florence Morfin,^d Bruno Lina,^{a,d} Béatrice Riteau,^{a,e} and Jean-Claude Cortay^a

VirPath, EMR 4610, Virologie et Pathologie Humaine, Université Lyon 1, Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Est, Secteur Laennec, Lyon, France^a; Biocrystallographie et Biologie Structurale des Cibles Thérapeutiques, Université Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, and CNRS, UMR 5086, Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, Vercors, France^b; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Unité de Virologie Humaine, INSERM U758, Université Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France^c; Laboratoire de Virologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France^d; and INRA, Tours, France^e

Human rhinoviruses (HRVs) remain a significant public health problem as they are the major cause of both upper and lower respiratory tract infections. Unfortunately, to date no vaccine or antiviral against these pathogens is available. Here, using a high-throughput yeast two-hybrid screening, we identified a 6-amino-acid hit peptide, LVLQTM, which acted as a pseudosubstrate of the viral 2A cysteine protease (2A^{Pro}) and inhibited its activity. This peptide was chemically modified with a reactive electrophilic fluoromethylketone group to form a covalent linkage with the nucleophilic active-site thiol of the enzyme. *Ex vivo* and *in vivo* experiments showed that thus converted, LVLQTM was a strong inhibitor of HRV replication in both A549 cells and mice. To our knowledge, this is the first report validating a compound against HRV infection in a mouse model.

Human rhinoviruses (HRVs) belong to the enterovirus group of the *Picornaviridae* family and are the main causative agents of the common cold, asthma exacerbations, and chronic obstructive pulmonary disease in humans (22). To date, there is no vaccine against HRV as there is almost no cross protection between the nearly 100 serotypes identified so far (21). Furthermore, no antiviral treatment against HRV is currently available on the market. Thus, there is an urgent need for validation of new compounds against HRV.

Among several antiviral strategies attempting to impair rhinovirus replication, one consists of blocking the activity of the viral HRV 2A protease (2A^{Pro}). Targeting 2A^{Pro} is of particular interest as it is a cysteine protease playing multifunctional roles necessary for viral replication. These roles include (i) autoprocessing by *cis* cleavage at the VP1-2A^{Pro} junction; (ii) inhibition of the host cell translation through cleavage of the initiation factor eIF4G (17, 27) and the poly(A)-binding protein (PABP) (10); (iii) contribution to the deleterious overwhelming host cellular defense (3, 9, 23); and (iv) strengthening of viral polysome formation and stability (11, 12).

Several 2A^{Pro} inhibitors have already been described and include alkylating agents such as iodoacetamide or *N*-ethylmaleimide that can react with the catalytic cysteine of the enzyme and that have been shown to reduce 2A^{Pro} activity (15). Moreover, as the substrate-binding pocket of elastase is similar to that of 2A^{Pro}, two substrate-derived elastase inhibitors, elastinal and methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethylketone have been reported to inhibit the *in vitro* proteolytic activity of 2A^{Pro} and consequently reduce viral yields of HRV type 14 (HRV-14) and poliovirus type 1 (PV-1) (18). Furthermore, it has been demonstrated that the irreversible caspase inhibitor benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(methoxy)-fluoromethylketone (z-VAD-fmk) (7) is also able to directly inactivate HRV and coxsackie B virus type 4 (CBV4) 2A^{Pro} enzymes (5). However, none of these compounds has ever been tested *in vivo*, thus impairing the validation of their efficacy in preclinical assays and the possibility to go further in the development of anti-HRV therapies.

The aim of this study was to design a peptide inhibitor of HRV-2 2A^{Pro} and to test its antiviral activity *ex vivo* in A549 cells and *in vivo* in mice which are susceptible to infection by the minor HRV group member HRV-2.

Here, we report the identification of the LVLQTM peptide as a decoy substrate for 2A^{Pro} that blocked enzyme activity upon binding and consequently affected HRV-2 replication *ex vivo* and *in vivo* when administered to infected mice. This is the first study validating such a compound *in vivo* in mice, opening new prospects for testing other drugs.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. Experiments were performed according to recommendations of the National Commission of Animal Experiment (CNEA) and the National Committee on the Ethic Reflexion of Animal Experiments (CNREEA). The protocol was approved by the Committee of Animal Experiments of the University Claude Bernard Lyon I (permit number BH2008-13). All animal experiments were also carried out under the authority of a license issued by la Direction des Services Vétérinaires (accreditation number 78-114). All efforts were made to minimize suffering.

Yeast two-hybrid analysis. Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics, S.A., Paris, France. The full-length coding sequence for HRV-2 2A^{Pro} (GenBank accession number X02316) was amplified by PCR and cloned into pB27 plasmid as a C-terminal fusion to LexA (LexA-p2A). The construct was validated by sequencing and used as bait to screen a random-primed human placenta cDNA library constructed into pP6 plasmid. pB27 and pP6 plasmids were derived from the original pBTM116 and pGADGH plasmids, respectively (34).

A total of 53.1 million clones (6-fold the complexity of the library) were screened using a mating approach with Y187 (*matα*) and L40ΔGal4

Received 31 May 2011 Accepted 21 October 2011

Published ahead of print 9 November 2011

Address correspondence to Jean-Claude Cortay, cortay@univ-lyon1.fr.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.05263-11

(*mata*) *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains, as previously described (6). Fifty-one His⁺ colonies were selected on a medium lacking tryptophan, leucine, and histidine and supplemented with 100 mM 3-aminotriazole to suppress bait autoactivation. The prey fragments of the positive clones were then amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The resulting sequences were used to identify the corresponding interacting proteins in the GenBank database (NCBI) using a fully automated procedure.

Bacterial expression vectors and protein purification. Synthetic genes (Eurofins MWG Operon) coding for HRV-2 2A^{Pro} or echovirus 6 (EV-6) 2A^{Pro} (GenBank accession number [AY302558](#)) were cloned between the NdeI and XhoI sites of the pSCodon1.2 vector (Eurogentec) in fusion with either a Strep•Tag (WSHPQFEK) or a (His)₆ tag at their C termini. Recombinant plasmids were used to transform the *Escherichia coli* B SE1 strain [F⁻ Cm^r *ompT lon hsdSB* (r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3) (*lacI*, T7 polymerase under the control of the PlacUV5 promoter) *ccdB*⁺]. Bacteria were grown in the autoinduction medium ZYP-5052 (30) at 37°C for 5 to 6 h with vigorous shaking in baffled flasks, before growing to saturation at 20°C within 16 to 18 h. Subsequent purification steps were performed at 4°C. Cells were lysed with BugBuster protein extraction reagent (Novagen), and clarified supernatants were applied to the corresponding affinity chromatography resins. Strep•Tag proteins were purified using a StrepTrap HP resin (GE Healthcare) and His-tagged proteins were purified using a HIS-Select HF nickel resin (Sigma) according to the respective manufacturers' instructions. In each case, proteins were dialyzed against buffer D (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 4 mM dithiothreitol [DTT]) and concentrated using a Vivaspin centrifugal concentrator device (Sartorius Stedim Biotech). Enzymes were stored at -20°C in buffer D containing 50% glycerol.

In vitro cleavage assays. Different protease recognition site-coding sequences were inserted between the NheI and BglII sites in a short polypeptide linker that connects the native N and C termini of a circularly permuted firefly luciferase in the pGloSensor-10F linear vector (Promega). The resulting plasmids were then used as templates in a cell-free system for the expression of the corresponding GloSensor proteins containing the protease sites of interest. *In vitro* transcription/translation reactions were carried out in a TNT SP6 high-yield wheat germ master mix (Promega) supplemented with [³⁵S]methionine according to the manufacturer's protocol. Reaction mixtures were incubated for 2 h at 25°C. Two micrograms of recombinant tobacco etch virus (TEV) protease, HRV-2 2A^{Pro}, or EV-6 2A^{Pro} was added to 13 μl of the *in vitro* translation reaction mixture and 13 μl of 2× digestion buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 4 mM DTT [for TEV protease], 100 mM HEPES-NaOH, pH 7.9, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT [for HRV-2 2A^{Pro}], 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, and 10 mM DTT [for EV-6 2A^{Pro}]) and incubated for 45 min at 30°C. Aliquots of total proteins were removed 0, 15, 30, and 45 min postincubation and separated in a 12% SDS-polyacrylamide gel. Autoradiography was performed after fluorography treatment. The 61-kDa band intensity was determined by densitometric analysis after background subtraction using Bio-Rad Quantity One one-dimension software. Luminescence detection was performed by diluting the remaining volume of each protease digestion and negative-control reaction mixture 1:20 in nuclease-free water, and 100 μl of these dilutions was added to each well of a white, flat-bottom 96-well plate. Each reaction was analyzed in triplicate. After addition of 100 μl Bright-Glo assay reagent to each well and incubation for 2 to 5 min at room temperature, luminescence was measured using a GloMax 96-well microplate luminometer. According to the manufacturer's instructions, the fold activation of each luciferase activity was calculated as follows: [(luminescence from tube A) - (luminescence from tube C)]/[(luminescence from tube B) - (luminescence from tube D)], where tube A contains a Plus-DNA TNT reaction mixture and HRV-2 2A^{Pro}, tube B contains a Plus-DNA TNT reaction mixture only, tube C contains a no-DNA TNT reaction mixture and HRV-2 2A^{Pro}, and tube D contains a no-DNA TNT reaction mixture only.

Pulldown experiments. For His pulldown assays, a PCR-amplified fragment corresponding to truncated proteins consisting of the C-terminal part (amino acids 274 to 520) of the functionally uncharacterized RBM6Δ6 protein (RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀) or RBM6₂₇₄₋₆₆₀ was inserted into the NcoI-XhoI sites of the expression vector pET-28 (Novagen). Translated proteins were synthesized *in vitro* using a T7 RNA polymerase-based TNT-coupled reticulocyte lysate system (Promega). HRV-2 2A^{Pro}-(His)₆ fusion protein was bound to nickel nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) magnetic agarose beads (Qiagen) and incubated for 1 h with 50 μl *in vitro*-translated [³⁵S]methionine-labeled RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ or RBM6₂₇₄₋₆₆₀ in a total volume of 1 ml of incubation buffer (25 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, and 0.005% Tween 20). Resin was collected with a magnetic separator and washed twice with 500 μl incubation buffer. Washed beads were resuspended in 40 μl of 2× SDS sample buffer, heated for 5 min, and pelleted in a microcentrifuge. Proteins from the supernatant were then subjected to a 12% SDS-PAGE. Gels were treated with Amplify reagent (GE Healthcare) for fluorography or subjected to Western blot analysis using a polyclonal antihistidine antibody (Cell Signaling). The amount of labeled proteins which coeluted with HRV-2 2A^{Pro}-(His)₆ was quantified by densitometric analysis.

For Strep•Tag pulldown assays, the RBM6Δ6 LVLQTM-derived peptide-coding sequence was cloned in frame between two BsaI sites within the pET-SUMO vector (Invitrogen), allowing its expression in fusion with the C terminus of the SUMO protein. In addition, the Strep•Tag sequence WSHPQFEK was added at the N terminus of the fusion protein. This construct was transferred into the pSCodon1 vector, and recombinant Strep•Tag-SUMO-LVLQTM was expressed in the *E. coli* SE1 strain. Subsequent incubation reactions were performed under the same conditions described above, except that equal volumes of cleared lysates prepared from bacteria overproducing either Strep•Tag-SUMO-LVLQTM or HRV-2 2A^{Pro}-(His)₆ proteins were mixed (to a 1-ml final volume) with Strep-Tactin magnetic beads (Qiagen). Proteins which were specifically bound to the washed beads were separated by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue R250. (His)₆-tagged proteins were also revealed with a polyclonal antihistidine antibody (Cell Signaling).

Cleavage of TRPIITTA-pNA substrate by HRV-2 2A^{Pro}. Cleavage of the TRPIITTA-*p*-nitroanilide (pNA) substrate by HRV-2 2A^{Pro} was performed at 25°C for 10 min in a 1-ml reaction mix containing 50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, and purified recombinant HRV-2 2A^{Pro} (0.2 μM). The reaction was started by the addition of the TRPIITTA-pNA peptide (Eurogentec) at 25 μM and monitored continuously at 405 nm to characterize the initial velocity of the cleavage reaction. Peptide competition cleavage assays were performed under the same conditions, except that purified Strep•Tag-SUMO-LVLQTM protein (0 to 25 μM) was added to the reaction mix. Percent inhibition values were referred to as the ratio between initial velocity cleavage values measured with and without inhibitor. Data are expressed as means of three independent experiments, and standard deviations are indicated.

Molecular modeling. The crystal structure of the free HRV-2 2A^{Pro} has been used (Protein Data Bank [PDB] accession number 2hrv) (24). The conformation of the LVLQTM peptide was modeled using the one in complex with the foot-and-mouth disease virus (FMDV) 3C^{Pro} as a starting model (PDB accession number 2wv4) (35). Side chains from the FMDV 3C protease-bound peptide were replaced with the side chains of VLQTM and then energy minimized using a GROMOS96 43B1 force field (32).

Cell culture and transient expression. Human epithelial lung carcinoma A549 cells (CCL-185; ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Lonza) and 1 g/liter glucose supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, penicillin, and streptomycin. RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ and RBM6Δ6₂₇₄₋₅₁₄-coding sequences were amplified by PCR and cloned into the multiple-cloning site of the pCI-neo vector (Promega) downstream from the following 2× Strep•Tag sequence: MASWSHPQFEKGGGSGGGSGGWSHPQFEK (where the underlining indi-

cates the Strep-Tag sequence). All plasmid constructs were transfected into cells using NanoJuice transfection reagents (Novagen), according to the manufacturer's instructions.

Western blotting. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated for 1 h in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat milk powder at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with a polyclonal antihistidine antibody (reference no. 2365; Cell Signaling) or an antiserum recognizing the C-terminal domain of eIF4G (19). These antibodies were revealed using the horseradish peroxidase-coupled goat antirabbit antibody, followed by chemiluminescence detection using the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate from Pierce.

In vitro transcription and RNA transfection. Plasmids containing the 2A protease-coding region were constructed by inserting the respective coding sequences into the pGlo-Renilla vector (29). For *in vitro* transcription, DNA templates were linearized at the EcoRI site downstream from a synthetic poly(A) tail. Capped RNAs were transcribed using the T7 RNA polymerase as previously described (25) and treated with RQ1 DNase (Promega). The integrity of the RNAs was checked by electrophoresis on nondenaturing agarose gels, and the concentration was quantified by spectrophotometry at 260 nm using a Nanodrop apparatus (Nanodrop Technologies).

Two days before RNA transfection, A549 cells were seeded into 48-well plates at 75,000 cells per well to reach about 180,000 cells at the time of transfection. RNA transfection was performed with 100 ng of 2A^{pro}-coding RNA and the TransIT kit (Mirus Bio) for 2 h and 50 ng of Renilla-coding RNA for additional 3 h. The cells were then harvested, and luciferase activity was quantified using the Renilla luciferase (R-Luc) assay system from Promega and a Veritas microplate luminometer (Turner BioSystems). Transfection efficiency was evaluated by transfecting the green fluorescent protein (GFP)-coding RNA under the same conditions and counting the number of green fluorescent cells by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. Over 70% of A549 cells expressed GFP.

Virus infection. HRV-2 (GenBank accession number X02316) and HRV-14 (GenBank accession number K02121) were provided by the WHO/National Reference Centre for Enteroviruses (Lyon, France). A549 cells (90% confluence) were infected with HRV-2 or HRV-14 at a multiplicity of infection (MOI) of 1 in DMEM containing 2% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, penicillin, and streptomycin and incubated at 34°C. Virus titer was quantified by the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) assay using MRC5 cells according to the method of Reed and Muench (26).

Infection and mouse treatment. Six-week-old BALB/c female mice were purchased from Charles River Laboratories, and experiments were undertaken as previously described (13). On the day of infection, a three-step protocol was used for peptide administration: (i) first, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (42.5 mg/kg of body weight), (ii) then, a 25-μl volume of HRV-2 suspension containing 100,000 PFU was injected dropwise to the external nares of the mice using a micropipette, and (iii) finally, a 25-μl volume of the indicated concentration of peptide solution dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) was administered in the same way either right after infection or at 12 h postinoculation. Lungs were harvested at different time points postinfection and ground in the Tissue Lyser LT device from Qiagen. After centrifugation at 12,000 × g for 5 min at 4°C, supernatants were collected and virus titers were determined as described above. Ten mice were used for each experimental condition.

Statistical analysis. The Mann-Whitney U test was used to evaluate statistical significance ($P < 0.05$) of viral replication *in vivo*.

RESULTS

Yeast two-hybrid screening for proteins interacting with HRV-2 2A^{pro}. In order to identify partners and potential inhibitors of

```

CL27/ TVSTYIHQQTQVDFYAGKSEMPVCR L R L K N L(COOH)
CL35/ PNGFRPFCCHTQQTMGWAFRPSQGHQG L R L R N L(COOH)
CL45/ LRLHACKVK I K L V T L(COOH)
CL52/ GRKQS L S L V T L(COOH)
CL41/ DPL F R L T T L(COOH)
CL22/ ARARCHRGREGSSSVRKAATLPQDGT L C L H T C(COOH)
CL51/ GIN L F L Y T C(COOH)
CL25/ FAYLFKNKNTQNKFK L Y I Y T V(COOH)
CL43/ ARSWT L K L Q T V(COOH)
CL46/ RBM6Δ6(aa 274-514) L V L Q T M(COOH)
Consensus sequence L X L X T Φ
N

```

```

Cleavage site P6 P3 P4 P3 P2 P1/P1'
HRV-2 polyprotein R I I T T A/GPS
HRV-62 polyprotein Q N L Q T A/GPS
PABP T S T Q T M/GPR

```

FIG 1 Amino acid sequences of the HRV-2 2A^{pro}-binding peptides identified by the yeast two-hybrid system. Peptides are arranged to illustrate the consensus sequence found, where X is any amino acid and Φ is a hydrophobic amino acid. Alignments of the carboxy termini of 2A^{pro}-binding peptides with natural cleavage sites of 2A^{pro} are also shown.

HRV 2A^{pro}, a plasmid expressing a LexA–HRV-2 2A^{pro} fusion protein was used to screen a human placenta cDNA library using Y187 (*mata*) and L40αGal4 (*mata*) yeast strains. Fifty million clones were screened, and 51 His⁺ colonies were further isolated and characterized by DNA sequencing and sequence alignment analysis. Among these clones, nine encoded out-of-frame short polypeptides and one encoded the C-terminal part (amino acids 274 to 520) of the functionally uncharacterized RBM6Δ6 protein (GenBank accession number FLJ56542) (31). As depicted in Fig. 1, all exhibited related sequences that shared the same peptide consensus motif LXLX(T/N)Φ, where X represents any amino acid and Φ represents a hydrophobic residue. Interestingly, this sequence partially mimics the consensus sequence P_4 LX(T/N) X_{P_1} found in 2A^{pro} substrates where threonine (or asparagine) and leucine are required in positions P₂ and P₄, respectively, for 2A^{pro} cleavage (16). In addition, the tripeptide motifs P_3 QTM P_1 and P_4 LQT P_2 found in the RBM6Δ6 sequence are identical to those found at the corresponding positions within the 2A^{pro} substrates PABP1 and VP1–2A^{pro} junction of the HRV-62 polyprotein, respectively (16). Finally, the presence of methionine at the P₁ position represents a favorable determinant for 2A^{pro} binding (28). Remarkably, the presence of a conserved leucine (or an equivalent hydrophobic residue) at the P₆ position in all selected peptides suggests that this amino acid may represent an important parameter in the specificity of recognition by 2A^{pro}. Thus, these results strongly suggested that the LXLX(T/N)Φ motif peptides isolated in the double-hybrid screening are partners of HRV-2 2A^{pro}.

The LXLX(T/N)Φ motif behaves as a pseudosubstrate of HRV-2 2A^{pro}. To investigate whether the previously characterized peptides were pseudosubstrates of HRV-2 2A^{pro}, different hybrid peptides were built by fusing the six terminal amino acid residues of the 10 polypeptides identified by yeast two-hybrid screening with the GPSDM sequence found at the P₁' and P₅' positions of the authentic *cis*-cleavage site of the HRV-2 polyprotein (Fig. 1). The 11-mer peptides obtained were then inserted in frame into a genetically engineered firefly luciferase which was synthesized in a cell-free protein expression system in the presence of [³⁵S]methionine and used as a protease substrate (Fig. 2A). In this assay, cleav-

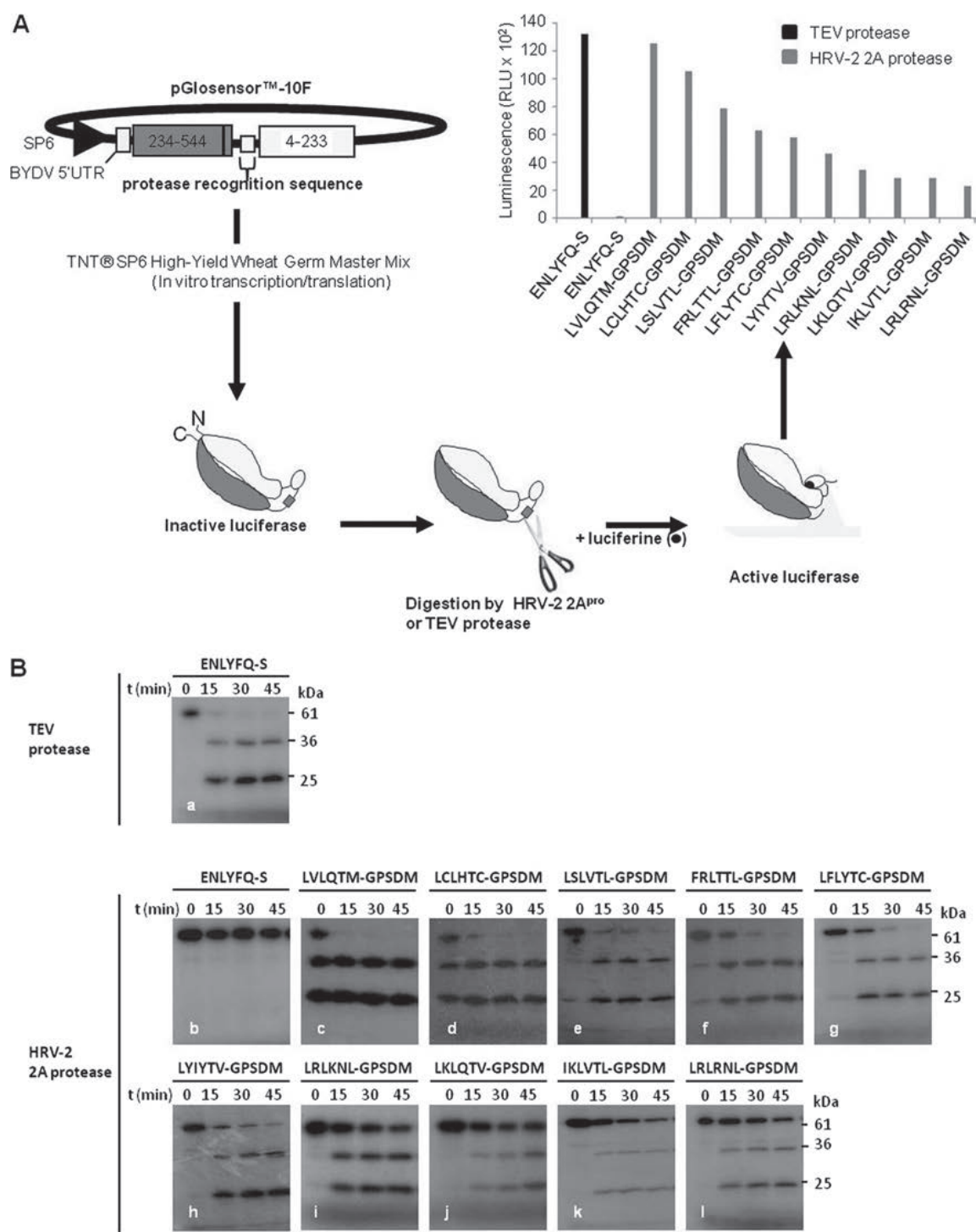


FIG 2 HRV-2 2A^{pro}-binding peptides identified by the yeast two-hybrid system are pseudosubstrates of the protease. (A) ³⁵S-labeled GloSensor protease site luciferase activation by HRV-2 2A^{pro} digestion of hybrid sites generated from sequences depicted in Fig. 1. To generate the GloSensor protein, new N and C termini were created at amino acids 234 and 233, respectively. The protein-coding region of this circularly permuted firefly luciferase was carried on the pGloSensor-10F linear vector. Insertion of a protease recognition sequence between these native N and C termini and cleavage of the sequence by the cognate protease activate the luciferase enzyme. Plasmid DNAs encoding the protease recognition sequences indicated on the graph were transcribed and translated *in vitro* and incubated with purified HRV-2 2A^{pro} or TEV protease for 45 min. Luminescent signal was measured by mixing an aliquot of each TNT reaction mixture with Bright-Glo assay reagent in triplicate and incubating for 5 min at room temperature. Luminescence was measured using a luminometer. A plasmid DNA encoding the ³⁵S-labeled GloSensor ENLYFQ-S protein, where ENLYFQ-S is a cleavage site of the TEV protease, was used as a control. RLU, relative light units. (B) The different ³⁵S-labeled GloSensor proteins containing the protease sites to be tested were synthesized *in vitro* as described above and then incubated with 2 μg of TEV protease or HRV-2 2A^{pro} for 45 min, followed by SDS-PAGE and fluorography. Gel patterns corresponding to enzymatic digestion performed with TEV protease (a) and HRV-2 2A^{pro} (b to l) are shown. The 0-h time point shows proteins that were harvested right after addition of the proteases in the incubation mixtures.

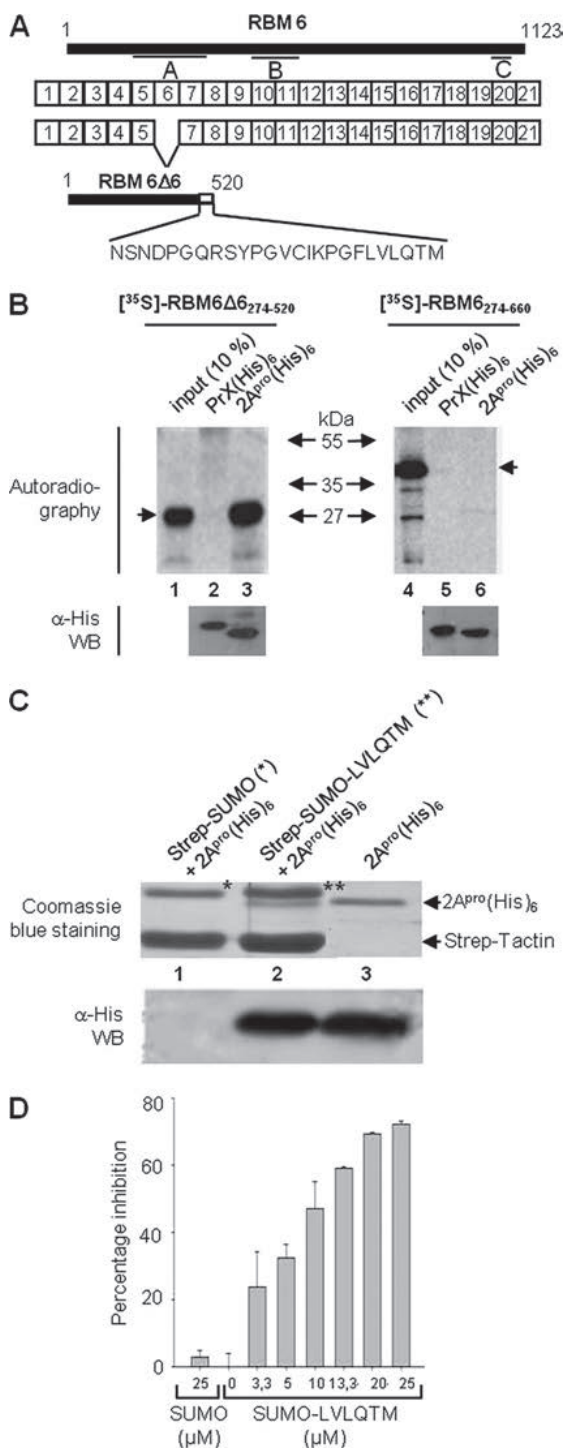


FIG 3 The last six residues of RBM6Δ6 are necessary and sufficient for the interaction with HRV-2 2A^{pro}. (A) Schematic representation of the exon structure of the *RBM6* gene and the protein products derived from two splice variants (data are from references 14 and 31). Boxes represent exons and are not drawn to scale. The bars below RBM6 indicate different protein motifs, as follows: A and B, RNA binding motif RNP1 and RNP2; C, G patch. In the truncated RBM6Δ6 protein, the amino acid residues represented by the white part differ from those in the longer protein product RBM6 due to a frame shift caused by the splicing. (B) Results of a His pull-down assay with HRV-2 2A^{pro} and RBM6Δ6. HRV-2 2A^{pro}-(His)₆ was immobilized on affinity resin and incubated with *in vitro*-translated ³⁵S-labeled RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ or RBM6₂₇₄₋₆₆₀ protein. Bound proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. Lanes 1 and 4, 10% of total proteins from the initial incubation

age of the recombinant luciferase at the protease recognition sequence led to the activation of the luciferase enzyme, resulting in an increase in luminescence when a firefly luciferase substrate was added to the reaction mixture. Thus, if a peptide acted as a pseudosubstrate for 2A^{pro}, an increase in luciferase activity would be observed. As shown in Fig. 2A, significant luciferase activity was detected for all constructs tested, and the best score was measured for the ³⁵S-labeled GloSensor LVLQTM-GPSDM protein, the protease site of which was derived from the C terminus of the RBM6Δ6 protein. Luminescence was hardly detectable when using the negative control, ³⁵S-labeled GloSensor-10F ENLYFQ-S protein, which was recognized by the tobacco etch virus protease but not by HRV-2 2A^{pro}. In contrast and as expected, the ³⁵S-labeled GloSensor-10FENLYFQ-S protein was cleaved by the TEV protease, resulting in increased luminescence. Thus, our results confirmed that all peptides isolated by yeast two-hybrid screening behaved as potent substrate analogues of HRV-2 2A^{pro}.

Cleavage of the ³⁵S-labeled GloSensor-10F-identified peptide-GPSDM luciferases (61 kDa) by HRV-2 2A^{pro} was also visualized after separation of digested products by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 2B, panels c to l). Total inactivation of the proteases was effective only by boiling the sample for 5 min in SDS loading buffer, which may explain the partial substrate degradation at the initial time in panels c and d and reflected a higher affinity of HRV-2 2A^{pro} for LVLQTM-GPSDM and LCLHTC-GPSDM sequences than for the other substrates. Moreover, all ³⁵S-labeled GloSensor-10F-identified peptide-GPSDM luciferases were hydrolyzed by HRV-2 2A^{pro} into two predictive fragments of 36 and 25 kDa, confirming that all identified peptides were substrate analogues of 2A^{pro}. As expected, the ³⁵S-labeled GloSensor-10F ENLYFQ-S protein was cleaved by the TEV protease but not by the 2A protease of HRV-2 (Fig. 2B, compare panels a and b). In addition, the kinetics of digestion were peptide dependent, with the highest rate being for the LVLQTM peptide. Thus, these results confirmed that the identified peptides acted as pseudosubstrates for HRV-2 2A^{pro}.

The LVLQTM peptide specifically interacts with HRV-2 2A^{pro}. Since the LVLQTM peptide displayed the highest affinity for the 2A protease, the interaction between these two binding

reaction; lanes 2 and 3, incubation of ³⁵S-labeled RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ with a control His-tagged protein and HRV-2 2A^{pro}-(His)₆, respectively; lanes 5 and 6, the corresponding assays conducted in the presence of RBM6₂₇₄₋₆₆₀. Binding of His-tagged proteins on the affinity resin was checked by Western blotting (WB) using an antihistidine antibody. (C) Results of a Strep pull-down assay with HRV-2 2A^{pro} and the RBM6Δ6-derived LVLQTM sequence. Bacterially expressed Strep-Tag-SUMO or Strep-Tag-SUMO-LVLQTM was incubated with HRV-2 2A^{pro}-(His)₆ and Strep-Tactin-coated magnetic beads. A Coomassie blue-stained gel of proteins bound on the affinity resin is presented: lane 1, Strep-Tag-SUMO and HRV-2 2A^{pro}-(His)₆; lane 2, Strep-Tag-SUMO-LVLQTM and HRV-2 2A^{pro}-(His)₆; lane 3, purified HRV-2 2A^{pro}-(His)₆. Symbols: *, Strep-Tag-SUMO; **, Strep-Tag-SUMO-LVLQTM. The presence of HRV-2 2A^{pro}-(His)₆ was confirmed by Western blot analysis using an antihistidine antibody. (D) Effect of the RBM6Δ6-derived peptide LVLQTM on cleavage of TRPIITTA-p-nitroanilide (TRPIITTA-pNA) by HRV-2 2A^{pro}. Various concentrations of the purified SUMO-LVLQTM protein (0 to 25 μM) were added to the TRPIITTA-pNA peptide, and their inhibitory effect on HRV-2 2A^{pro} catalysis was measured by collecting absorbance at 405 nm for 10 min at 25°C. The percentage of cleavage activity was calculated relative to the value obtained with no inhibitor. Data are expressed as means of three independent experiments, and standard deviations are indicated. SUMO protein was used as a control.

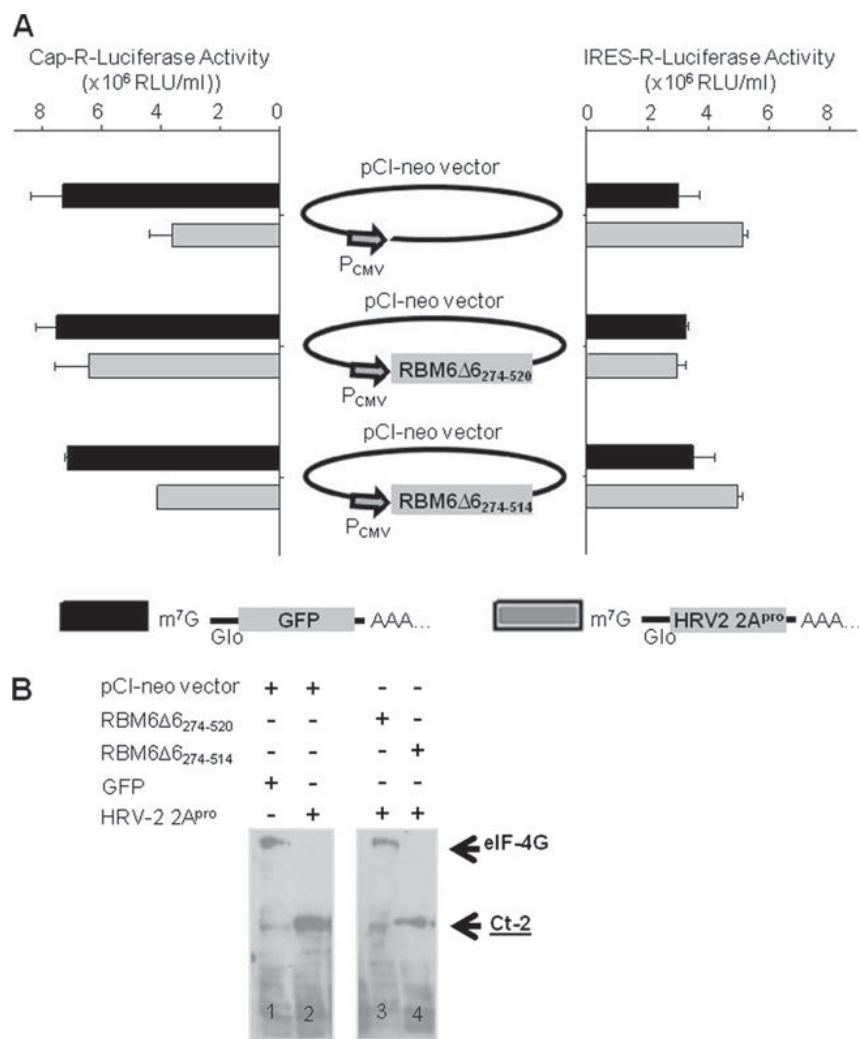


FIG 4 RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ inhibits eIF4G cleavage activity of HRV-2 2A^{Pro} in A549 cells. (A) A549 cells were transfected for 24 h with a pCI-neo plasmid harboring either the RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ or the RBM6Δ6₂₇₄₋₅₁₄ gene under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter and were subsequently transfected with an mRNA coding for HRV-2 2A^{Pro} or GFP for 2 h. The effect of the 2A protease on eIF4G cleavage and thus on the translation of capped mRNA was measured using a capped mRNA or an IRES-containing mRNA, both coding for the *Renilla* luciferase. The first contained the 5' UTR of the β -globin gene, which directed cap-dependent translation. The second contained the 5' UTR of the encephalomyocarditis virus (EMCV) RNA, which ensured an IRES-dependent translation. After 3 h of transfection of the luciferase RNAs, cells were lysed and luciferase activity was measured by luminometry. Error bars denote the standard deviation from the mean of three independent experiments. (B) Inhibition of the eIF4G cleavage activity of HRV-2 2A^{Pro}. A549 cells transiently expressing 2 \times Strep-Tag-RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ protein or 2 \times Strep-Tag-RBM6Δ6₂₇₄₋₅₁₄ for 24 h were subsequently transfected with an mRNA coding for HRV-2 2A^{Pro} or the GFP for 5 h. Total protein extracts (60 μ g) were prepared from transfected cells, separated by 6% SDS-PAGE, and blotted with an antibody directed against the C-terminal part of the eIF4G protein. The main cleavage product (at about 100 kDa) which resulted from the proteolytic activity of 2A^{Pro} is indicated Ct-2. The pCI-neo vector was used as a control for plasmid transfection. Of note, cells were lysed in the absence of protease inhibitor cocktail, possibly explaining the partial eIF4G hydrolysis observed in lanes 1 and 3.

partners was analyzed by two complementary pulldown assays. First, *in vitro*-translated [³⁵S]methionine-labeled RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ (truncated protein detected by yeast two-hybrid screening, 28 kDa) or its alternative splicing isoform, RBM6₂₇₄₋₆₆₀ (44 kDa, Fig. 3A), was incubated with purified recombinant HRV-2 2A^{Pro}-(His)₆ or with a His-tagged control protein bound to Ni-NTA magnetic agarose beads. As measured by densitometric analysis, about 15% of total RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ input bound to immobilized HRV-2 2A^{Pro} (Fig. 3B; compare lanes 1 and 3) but not to the control His-tagged protein (lane 2). In contrast, RBM6₂₇₄₋₆₆₀ failed to bind either protein (lanes 5 and 6). These results demonstrated that RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ specifically interacted with HRV-2 2A^{Pro}. Since RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ differed from RBM6₂₇₄₋₆₆₀ by its last

25 residues (Fig. 3A) and this region contained the particular LV LQTM sequence that was previously identified in the yeast two-hybrid system, these results suggested that LVLQTM was directly involved in the interaction with 2A^{Pro}.

A Strep-Tag pulldown assay was then used to investigate whether LVLQTM-derived peptide was sufficient for 2A^{Pro} binding (Fig. 3C). To this end, LVLQTM was first expressed in bacteria in fusion to the C terminus of a Strep-Tag-SUMO protein that allowed high specific binding on a Strep-Tactin affinity resin. Bacterial cell lysates containing either the Strep-Tag-SUMO-LV LQTM or the control Strep-Tag-SUMO recombinant protein were then mixed with a crude bacterial extract enriched with the recombinant HRV-2 2A^{Pro}-(His)₆ protein. After 1 h of incubation

with the Strep-Tactin resin, protein complexes were subjected to SDS-PAGE separation and Coomassie blue staining or Western blotting using an antihistidine antibody (Fig. 3C). Results revealed that HRV-2 2A^{pro}-(His)₆ proteins coeluted with Strep•Tag-SUMO-LVLQTM protein (lane 2) but not with Strep•Tag-SUMO protein (lane 1). Therefore, the LVLQTM peptide was necessary and sufficient for the interaction with 2A^{pro}. Altogether, these results identified LVLQTM as a binding partner of HRV-2 2A^{pro}.

HRV 2A^{pro} activity is inhibited by LVLQTM in a strain-independent manner. We next investigated whether LVLQTM binding to HRV-2 2A^{pro} inhibited its activity. To this end, the 2A^{pro} activity was measured *in vitro* by a specific cleavage assay using the chromogenic substrate TRPIITTA-*p*-nitroanilide, which mimics the native HRV-2 2A^{pro} substrate sequence at the VP1-2A junction. As shown in Fig. 3D, addition of increasing concentrations of the Strep•Tag-SUMO-LVLQTM protein inhibited the activity of 2A^{pro} in a dose-dependent manner. The residual enzyme activity was about 30% at a saturating concentration of inhibitor (25 μ M). Control experiments showed that at the same concentration, the Strep•Tag-SUMO protein did not display any inhibitory effect on protease activity. Thus, LVLQTM inhibited the activity of the viral enzyme *in vitro*.

To investigate whether inhibition of 2A^{pro} by LVLQTM was relevant *in cellulo*, a three-step procedure for quantifying the inhibitory effect of LVLQTM on the cleavage of eIF4G by HRV-2 2A^{pro} was designed. In this protocol, A549 cells were transfected (i) for 24 h with a plasmid expressing either the RBM6 Δ 6₂₇₄₋₅₂₀ fragment or the RBM6 Δ 6₂₇₄₋₅₁₄ fragment which was deleted from the LVLQTM motif, then (ii) for 2 h with a capped and polyadenylated mRNA coding for the HRV-2 2A^{pro} or the GFP protein as a control, and finally (iii) for 3 h with a reporter *Renilla* luciferase (R-Luc) mRNA containing either the 5' untranslated (UTR) of the β -globin gene (capped mRNA) or the encephalomyocarditis virus (EMCV) internal ribosome entry site (IRES) sequence (uncapped mRNA). This assay relied on the fact that in eukaryotic cells, the distribution of mRNAs between capped and uncapped is largely in favor of capped mRNAs, for which translation initiation depends on intact initiation complex factors eIF4G/eIF4E. In contrast, translation of IRES-containing RNAs can occur in the presence of proteolyzed eIF4G, as the latter requires only the carboxy-terminal part of the eIF4G molecule. Thus, the presence of intact eIF4G allows the translation of capped mRNAs and its hydrolysis indirectly benefits the translation of uncapped mRNA. As depicted in Fig. 4, in the presence of the pCI-neo vector (empty vector) and the GFP-coding RNA, eIF4G was not cleaved (Fig. 4B, lane 1) and translation of capped mRNA, as measured by reporter Cap-R-Luc, activity was favored compared to IRES-driven translation, which explained the low level of IRES-R-Luc activity (Fig. 4A). In contrast, expression of HRV-2 2A^{pro} in the presence of the pCI-neo empty vector led to eIF4G cleavage (Fig. 4B, lane 2), which inhibited capped mRNA translation and indirectly increased IRES-driven translation, as measured by the decrease in Cap-R-Luc activity and the increase in IRES-R-Luc reporter activity (Fig. 4A). In cells overproducing the authentic C terminus of the RBM6 Δ 6 protein (RBM6 Δ 6₂₇₄₋₅₂₀), the eIF4G cleavage activity of 2A^{pro} was notably reduced (Fig. 4B, lane 3) and the level of Cap-dependent luciferase translation was mildly affected (Fig. 4A). Expression of the C terminus of the RBM6 Δ 6 protein deleted from the LVLQTM sequence (RBM6 Δ 6₂₇₄₋₅₁₄) did not affect

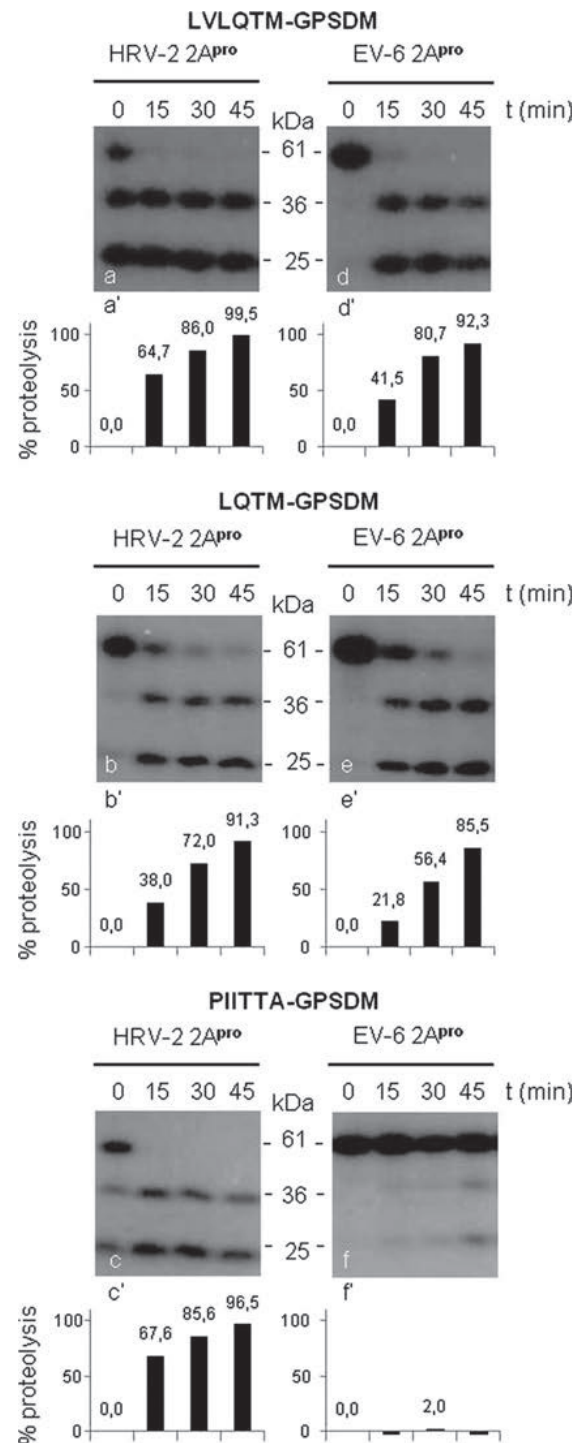


FIG 5 The RBM6 Δ 6-derived LVLQTM peptide is a pseudosubstrate of HRV-2 and EV-6 2A^{pro}. Three different ³⁵S-labeled GloSensor proteins containing the protease sites to be tested were synthesized *in vitro* under the same conditions described in the legend of Fig. 2 and then incubated with 2 μ g of HRV-2 2A^{pro} or EV-6 2A^{pro} for 45 min in cleavage buffer, followed by SDS-PAGE and fluorography. Gel patterns corresponding to enzymatic digestion performed with HRV-2 2A^{pro} (a to c) or EV-6 2A^{pro} (d to f) are shown. The percent hydrolysis of the ³⁵S-labeled GloSensor luciferases was determined by densitometric analysis of the 61-kDa band and calculated relative to its initial (0-min) intensity (a' to f'). The 0-h time point shows proteins that were harvested right after addition of the proteases in the incubation mixtures.

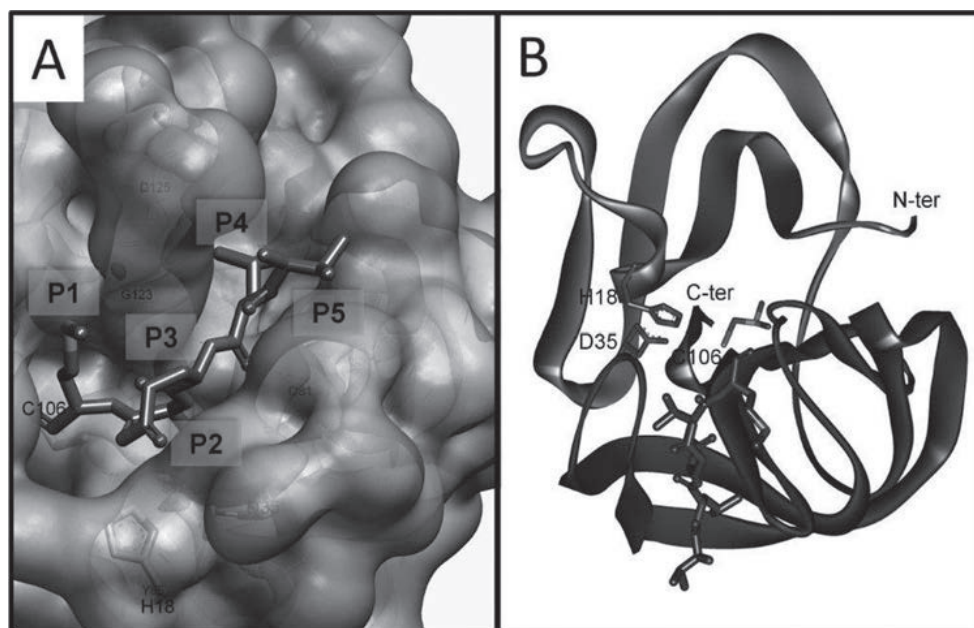


FIG 6 Model of the interaction between VLQTM peptide and substrate-binding pocket residues of HRV-2 2A^{Pro}. (A) Close-up view of the binding of the P5 to P1 residues from the LVLQTM inhibitor. The protease backbone is depicted as a line covered by a semitransparent Van der Waals surface, except for catalytic residues with large labels, depicted as sticks; protease-interacting residues have small labels. (B) Ribbon diagram of the overall structure of HRV-2 2A^{Pro} in complex with the peptidic inhibitor. Catalytic triad residues are labeled. C-ter, C terminus; N-ter, N terminus.

HRV-2 2A^{Pro} activity, showing that the RBM6Δ6₂₇₄₋₅₂₀ fragment specifically inhibited HRV-2 2A^{Pro} activity through its LVLQTM motif.

We further investigated whether LVLQTM binding to 2A^{Pro} was strain specific. To this end, susceptibility of the ³⁵S-labeled GloSensor LVLQTM-GPSDM protein to degradation by the HRV-2 2A protease was compared to that by the echovirus 6 (EV-6) 2A^{Pro} by the protease-Glo assay described above. Briefly, after *in vitro* translation with [³⁵S]methionine, the recombinant luciferase was incubated with purified HRV-2 2A^{Pro} or EV-6 2A^{Pro}, and the resulting digestion products were then separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography after treatment of gels with a fluorography solution. As shown in Fig. 5a, cleavage of full-length luciferase into its 36-kDa and 25-kDa predicted fragments was almost complete when HRV-2 2A^{Pro} was added to the reaction mix (0 h). Interestingly, a sequence lacking the LV residues (LQTM-GPSDM; Fig. 5b) had a significantly reduced hydrolysis rate (38%; Fig. 5b') after a 15-min incubation with the HRV-2 2A protease, showing that deletion of P5 and P6 residues in the LVLQTM-GPSDM sequence was detrimental to the recognition by HRV-2 2A^{Pro}. A control luciferase containing the authentic cleavage site found in the HRV-2 polyprotein (PIITTA-GPSDM; Fig. 5c and c') was cut by HRV-2 2A^{Pro} to the same extent as the LVLQTM-GPSDM hybrid site (Fig. 5a and a'). Similar results were obtained when reactions were carried out in the presence of purified 2A^{Pro} enzyme from EV-6, another member of the enterovirus genus (compare Fig. 5a to d and b to e, respectively). In contrast, a marked difference was observed for the HRV-2 control site, PIITTA-GPSDM, which, while cut by HRV-2 2A^{Pro}, was hardly recognized by the EV-6 2A^{Pro} (compare Fig. 5c and f), thus reflecting differences in substrate specificity between the two proteases, which share a relatively low level (40%) of amino acid sequence identity. Finally, the LVLQTM sequence in

RBM6Δ6 seemed to bind to the substrate-binding pocket of both HRV-2 and EV-6 2A^{Pro}, thus suggesting that this peptide may be effectively recognized by and thereby inhibit a wide range of 2A proteases.

Virtual docking of LVLQTM peptide into HRV-2 2A^{Pro} catalytic site. To get further insights into the interaction between the protease and its peptidic inhibitor, we decided to explore the orientations of the peptide by virtual docking in the substrate-binding pocket of HRV-2 2A^{Pro}. In conjunction, an extensive investigation of the impact of sequence variation in the peptide on the rate of cleavage was performed.

In the model depicted in Fig. 6B, the peptide largely bound within a deep surface groove that was diagonally oriented and intersected the cleft at the active site. Consequently, residues P5 to P1 mainly contacted the C-terminal β barrel, and the length of the groove was sufficient to accommodate residues P4 to P1 of the peptide. P5 Val at the N terminus of the peptide was largely solvent exposed (Fig. 6A), making a unique H bond through its N terminus, while its side chain was surrounded by polar side chains of Gln81 and Asp125. This lack of specific contact might suggest only a modest effect on substrate cleavage upon substitution at this position. On the other hand, P4 Leu was accommodated in an apolar depression defining the beginning of the peptide-binding groove, which consisted of side chains of Tyr78, Ile80, Ile96, and Ala129 (Fig. 6A). The side chain of P3 Gln pointed toward the solvent, which explained why, in common with other similar proteases, there was no strong preference for a particular residue at this position. Indeed, as shown by the protease-Glo assay approach, peptides displaying relatively different residues (Q, H, or V) at the P3 position were digested to about the same extent by 2A^{Pro} (Fig. 2A and B). The P2 Thr side chain inserted into the cleft between the β barrel and the N-terminal β sheet of the protease (Fig.

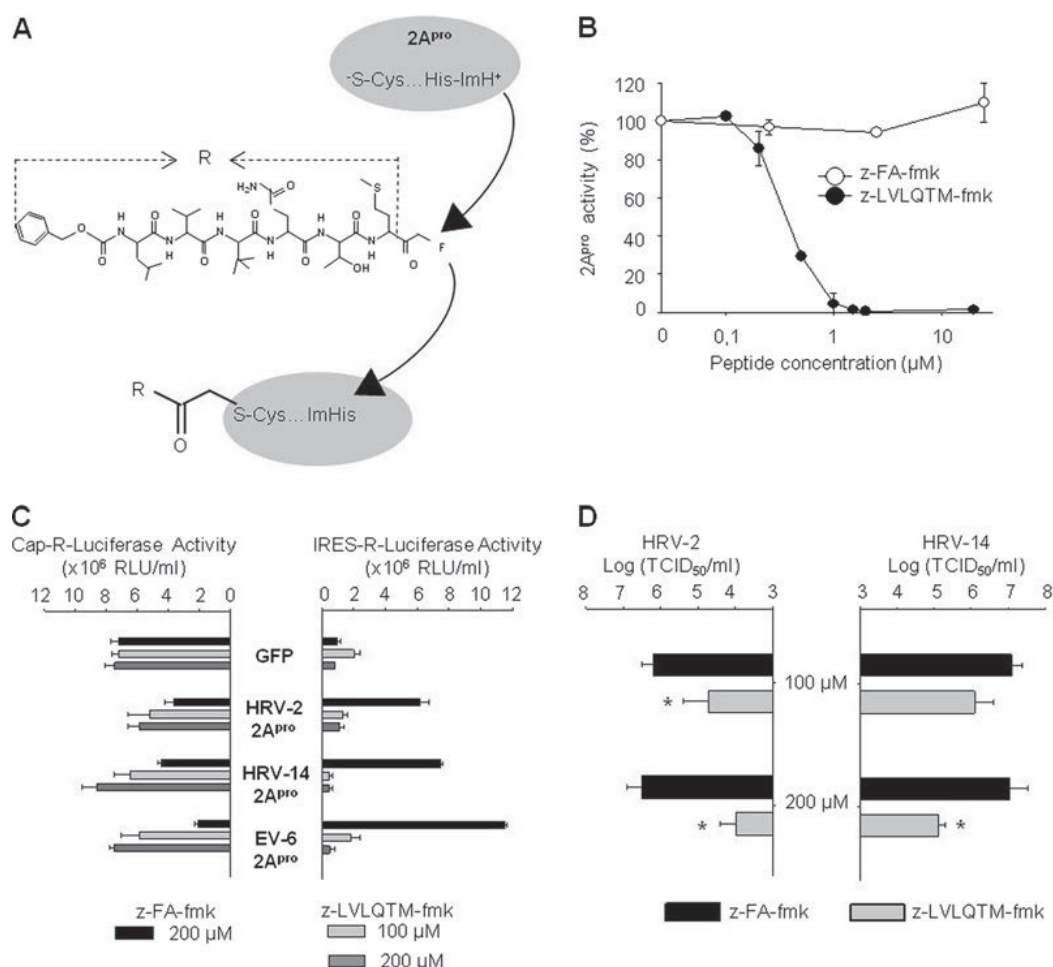


FIG 7 The z-LVLQTM-fmk peptide inhibits 2A^{pro} activity and HRV replication in A549 cells. (A) The LVLQTM peptide was synthesized and modified (MP Biomedicals Company) by adding a benzoyloxycarbonyl (z) at its N terminus and a fluoromethylketone (fmk) group at its C terminus to form z-LVLQTM-fmk. The latter is known to form a covalent link with the catalytic cysteine of the 2A^{pro} (20). (B) Effect of z-LVLQTM-fmk on cleavage *in vitro* of TRPIITTA-*p*-nitroanilide by the HRV-2 2A^{pro}. Various concentrations (0 to 25 μM) of z-LVLQTM-fmk or z-FA-fmk (RnD Systems) were added to the TRPIITTA-*p*-nitroanilide, and their effects on HRV-2 2A^{pro} catalysis was measured by collecting the absorbance at 405 nm for 10 min at 25°C. The percentage of cleavage activity was calculated relative to the value obtained with no inhibitor. Data are expressed as means of three independent experiments, and standard deviations are indicated. (C) A549 cells were treated with 100 μM or 200 μM z-LVLQTM-fmk or z-FA-fmk for 1 h and were subsequently transfected with an mRNA coding for HRV-2 2A^{pro}, HRV-14 2A^{pro}, EV-6 2A^{pro}, or GFP for 2 h. Cells were then transfected for 3 h with a capped mRNA or an IRES-containing mRNA, both coding for the *Renilla* luciferase. The first contained the 5' UTR of the β-globin gene, and the second contained the 5' UTR of the encephalomyocarditis virus (EMCV) RNA. Cells were subsequently lysed, and luciferase activity was measured by luminometry. Error bars denote the standard deviations from the mean values obtained from three independent experiments. (D) A549 cells were treated with different concentrations of z-LVLQTM-fmk or z-FA-fmk and infected with HRV-2 or HRV-14 at a multiplicity of infection of 1 for 12 h. The TCID₅₀ in the supernatant of infected cells was determined as described in Materials and Methods.

6A), where it made two hydrogen bonds with residues Ser83 and Tyr85, both belonging to the same side of the pocket. In our model and contrary to the one discussed by Petersen et al. (24), binding of P2 Thr did not require a prior rotation of Tyr85.

Finally, the P1 Met side chain made three hydrogen bonds with the substrate-binding pocket: two between its carbonyl group and both the carbonyl and side chain of Cys106 (3.1 Å for both H bonds) and one between its N atom and the hydroxyl group of Tyr85 (2.9 Å) (Fig. 6A). The flat and narrow pocket displayed very good chemical complementarities to the P1 Met side chain.

In the light of this structural model, we showed that the double mutation S83A/D125A resulted in an approximately 20-fold decrease in the initial rate of TRPIITTA-*p*-NA hydrolysis by 2A^{pro}

(data not shown), confirming that these two residues played a major role in the interaction with the LVLQTM peptide.

The z-LVLQTM-fmk peptide inhibits the replication of HRV-2 in A549 cells. As LVLQTM was found to inhibit 2A^{pro} activity, we then investigated whether it also inhibited HRV replication *ex vivo*. As pseudosubstrates are more potent inhibitors when covalently bound to their target proteases, we synthesized a modified LVLQTM peptide containing a fluoromethylketone group at its C terminus which forms a persistent, nonlabile covalent bond with the catalytic cysteine (Fig. 7A). Moreover, a benzoyloxycarbonyl group was added at its N terminus to increase its cell permeation. As expected, the z-LVLQTM-fmk molecule gave a sharp decrease in HRV-2 2A^{pro} activity in the TRPIITTA-*p*-nitroanilide substrate cleavage assay with a 50% inhibitory con-

centration value of 0.3 μM (Fig. 7B). In contrast, no inhibitory effect on 2A^{pro} activity was observed when this assay was conducted in the presence of the control peptide z-FA-fmk, which shared the same chemical changes as z-LVLQTM-fmk. Furthermore, inhibition of capped mRNA translation by HRV-2 2A^{pro} was significantly reduced by the z-LVLQTM-fmk peptide used at 100 μM and 200 μM (Fig. 7C) compared to the z-FA-fmk control peptide. These concentrations showed no cytotoxic effect on A549 cells (data not shown). The same inhibitory effect was observed using the same test with HRV-14 2A^{pro} (belonging to the rhinovirus species B) and EV-6 2A^{pro}, which again reinforced the idea that z-LVLQTM-fmk was not strain specific (Fig. 7C). Thus, the z-LVLQTM-fmk-modified peptide strongly and specifically inhibited several 2A^{pro} enzymes.

We next investigated the effect of LVLQTM on virus replication in A549 cells. For this purpose, cells were infected with HRV-2 or HRV-14 at a multiplicity of infection (MOI) of 1 in the presence of z-LVLQTM-fmk (100 μM or 200 μM) or the unrelated control peptide z-FA-fmk. At 12 h postinfection, the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) value in the supernatants of infected cells was determined. Results depicted in Fig. 7D indicated that the z-LVLQTM-fmk peptide inhibited HRV-2 and HRV-14 replication in a dose-dependent manner compared to the unrelated control peptide. Altogether, our data demonstrated that the observed decrease in virus production correlated directly with 2A^{pro}-mediated inhibition by the z-LVLQTM-fmk peptide.

The z-LVLQTM-fmk peptide protects against rhinovirus infection *in vivo*. To assess the role of z-LVLQTM-fmk *in vivo*, we investigated whether z-LVLQTM-fmk could inhibit HRV replication in mice. For this purpose, mice were inoculated with HRV-2 (10⁵ PFU/mouse) and, at the same time, treated or not with various concentrations of z-LVLQTM-fmk. Lungs of infected mice were then harvested at different time points postinfection, and infectious particles were evaluated by determining the TCID₅₀. As shown in Fig. 8A, compared to DMSO-treated mice, z-LVLQTM-fmk-treated mice had significantly fewer infectious viruses in their lungs. Without peptide treatment (DMSO) and at 24, 48, and 120 h postinfection, infectious virus titers reached 10⁶, 10^{6.75}, and 10^{6.82} TCID₅₀/ml, respectively. In contrast, after treatment of mice with 20, 200, or 500 μM z-LVLQTM-fmk, virus titers dropped to 10^{4.2} to 10⁵ TCID₅₀/ml for all the conditions tested. To confirm replication, an additional experiment was performed where mice were infected and lungs were harvested either immediately or at 48 h postinfection and then subjected to viral titrations (Fig. 8B). Results showed that the inoculum was totally recovered in the lungs of infected mice at day 0 postinoculation. When lungs were harvested at 48 h postinfection, the viral titer significantly increased, thus showing that viral replication indeed occurred after infection of the mice. In addition, the z-LVLQTM-fmk-mediated inhibition was specific since this peptide also impaired virus replication compared to the unrelated control peptide z-FA-fmk at 48 h postinfection (Fig. 8B). More importantly, when administration of the peptide was performed at 12 h postinfection, inhibition of viral replication was also readily detectable (Fig. 8C). The viral titers from control-treated animals reached 10^{6.53} TCID₅₀/ml, while the viral titer of z-LVLQTM-fmk-treated animals was 10^{4.08} TCID₅₀/ml at 48 h postinfection. Altogether, these results suggested that LVLQTM inhibited virus replication *in vivo* and could be of particular interest for anti-HRV therapies.

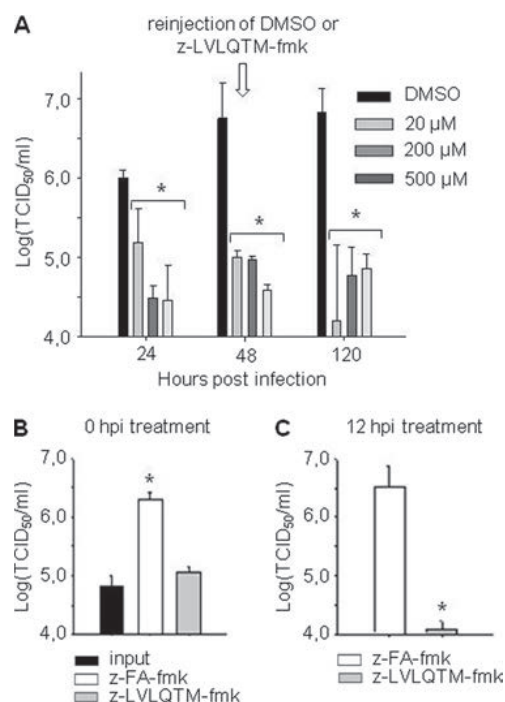


FIG 8 z-LVLQTM-fmk specifically inhibits HRV replication *in vivo*. (A) Mice were inoculated intranasally with 100,000 PFU HRV-2 per mouse (in a 25- μl volume) and treated with additional 25 μl of a solution containing the indicated concentrations of peptide or 1% DMSO. Lungs of infected mice were harvested at 24, 48, and 120 h postinfection, and virus titers were determined. (B) Mice were infected with HRV-2 as described above and treated with 20 μM z-LVLQTM-fmk or z-FA-fmk (control peptide). Lungs of infected mice were harvested immediately (input) or at 48 h postinfection (hpi). Virus titers were determined as described in Materials and Methods. (C) Mice were infected with HRV-2 (100,000 PFU) and treated with 20 μM z-LVLQTM-fmk or z-FA-fmk at 12 h postinfection. Lungs of infected mice were harvested at 48 h postinfection and virus titers were measured. *, $P < 0.05$.

DISCUSSION

Rhinoviruses are responsible for a large number of respiratory tract infections which range from the common cold to more serious complications, such as pneumonia, bronchitis, or bronchiolitis in children as well as in adults. These infections constitute a major public health problem and have a significant socioeconomic impact due to the fact that there is currently no effective drug to fight against HRV. In the search for an effective treatment against rhinovirus, we identified a peptide inhibitor of the viral 2A^{pro} by a yeast two-hybrid screening. This high-throughput screening allowed us to successfully identify 10 different peptides that were nonhydrolyzable by the 2A protease. Based on their sequence analysis, we postulated that these peptides could bind to the protease in a substrate-like manner (lock-and-key model). Direct evidence of peptide binding to the protease was provided by the protease-Glo assay, which elected the sequence motif LVLQTM derived from the very C terminus of the RBM6 Δ 6 protein to be the best candidate for subsequent development as an irreversible inhibitor of 2A^{pro}. This peptide had the following main features: (i) it specifically bound *in vitro* to the HRV-2 2A^{pro}, as demonstrated by pulldown assays. (ii) Its strong similarity to the amino-terminal half of natural cleavage sites of the protease meant that this motif behaved *in vitro* as a perfect pseudosubstrate not only of HRV-2 2A^{pro} but also

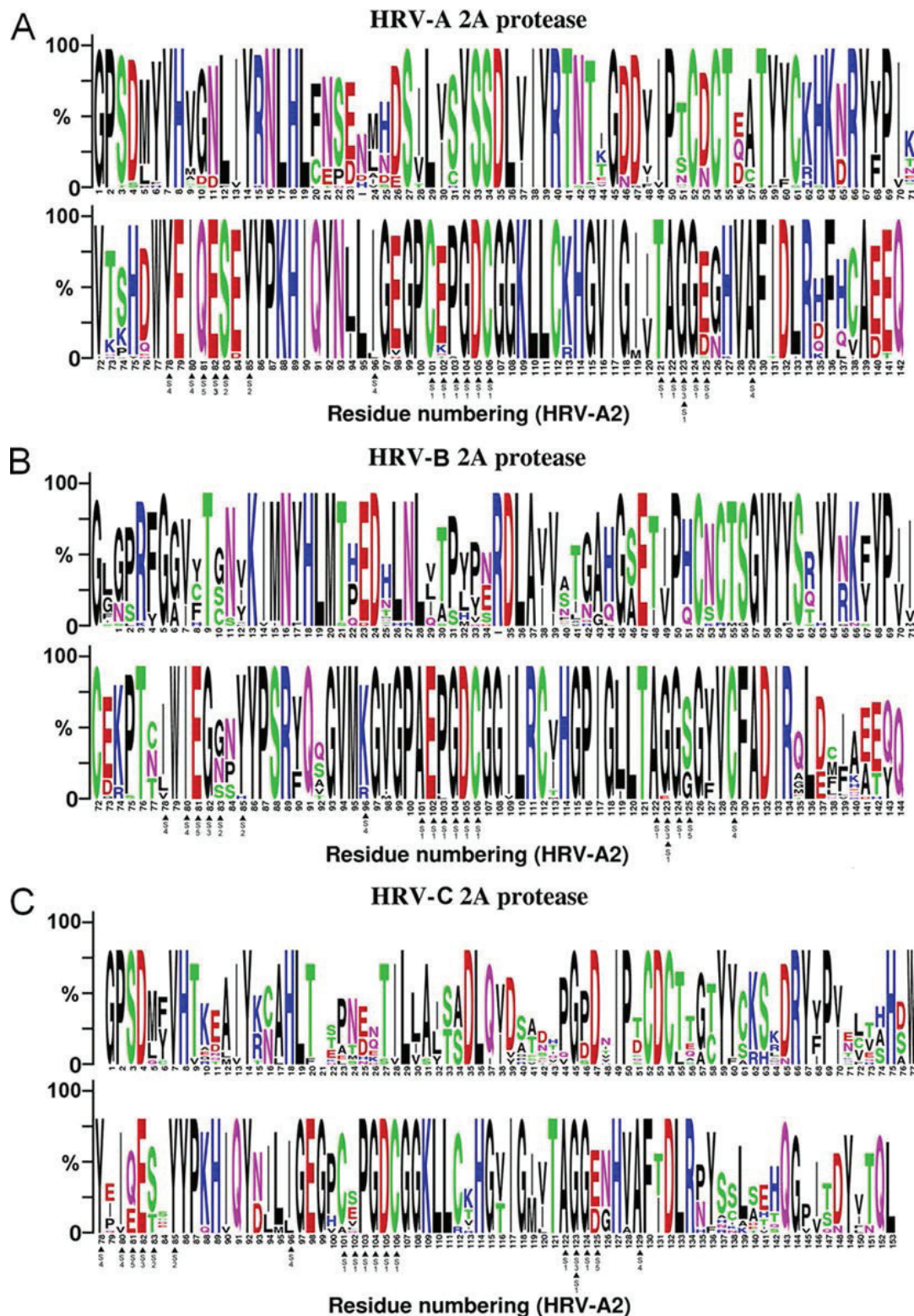


FIG 9 WebLogo sequence based on alignments of HRV type A, B, and C 2A proteases. These WebLogo sequences were generated using the WebLogo sequence generator (4) at <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> and were created using an alignment of 40 HRV-A sequences (A1, A2, A7, A9, A10, A11, A12, A13, A15, A16, A23, A24, A28, A29, A30, A34, A36, A38, A39, A41, A44, A46, A49, A53, A55, A56, A59, A64, A73, A74, A75, A76, A78, A82, A88, A89, A94, A101, A102, and A103) (A), 25 HRV-B sequences (B3, B4, B5, B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97, and B99) (B), and 12 HRV-C sequences (C1 to C11 and C15) (C). The letter size is proportional to the degree of amino acid conservation, and arrows indicate residues involved in the binding of the LVLQTM peptide at subsites S5 to S1.

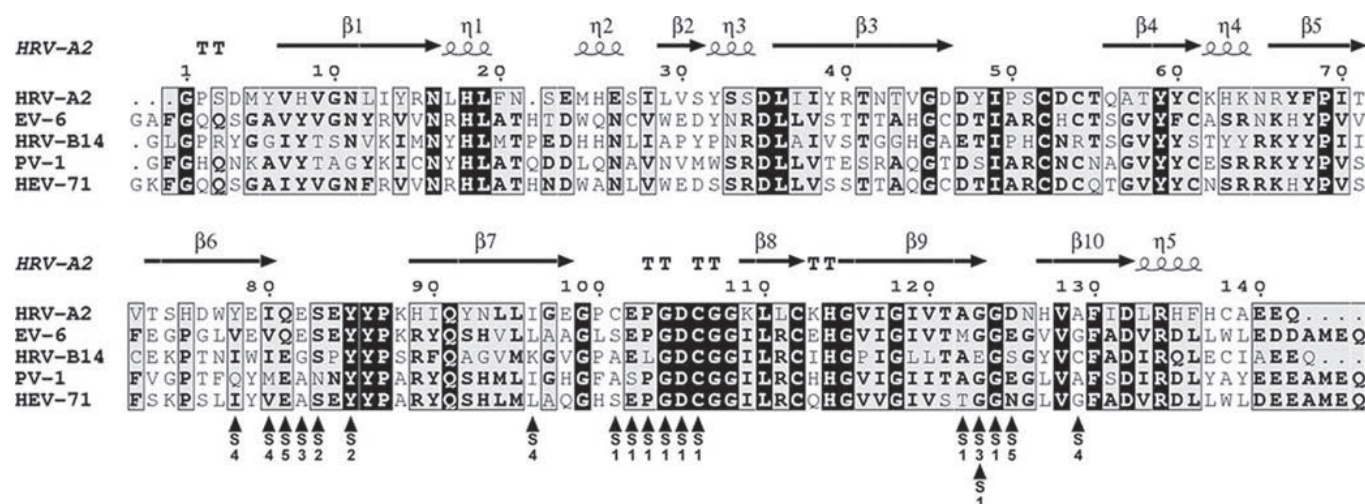


FIG 10 Multiple-sequence alignments of enterovirus 2A^{pro}. Sequence alignment was performed using the ClustalW program and plotted with the ESPrimer program (8). Similar residues are highlighted in gray; identical residues are in black. Secondary structure elements of HRV-2 2A^{pro} are shown above the sequences, while arrows indicate residues involved in the binding of the VLQTM peptide at subsites S5 to S1.

of EV-6 2A^{pro}, another enteroviral 2A protease. These enzymes share a relatively low level of amino acid sequence identity (40%), leading to substantially different surface characteristics, and thus represent two extremes in the primary sequence diversity of the 2A^{pro} family. (iii) It contained a P1 Met which was demonstrated to enhance significantly the binding affinity of the peptide for the enzyme (4, 28).

Therefore, our results support a molecular model whereby the C terminus of RBM6Δ6, acting as a competitive inhibitor of 2A^{pro}, docks into the substrate-binding pocket of the enzyme. Notably, in their screening of a HeLa cell cDNA expression library by the yeast two-hybrid procedure, Ventoso et al. (1999) (33) had previously characterized several four-amino-acid-binding peptides that interfered *in vitro* with PV-1 2A^{pro} activity. However, our data indicate that compared to its shorter version, LQTM, the LVLQTM sequence confers higher binding affinity to RBM6Δ6 for 2A^{pro}. These results thus highlighted the benefit which may be gained by using 6-mer-based peptides instead of 4-mer-based compounds directed against HRV 2A^{pro}.

To achieve a more potent inhibition of the 2A^{pro}, the LV LQTM peptide was modified so that it contained an electrophilic group (fmk) to enable the formation of a covalent bond with the active-site thiol and a benzyloxycarbonyl group (z) to increase its cell permeation. So modified, the z-LVLQTM-fmk compound was an effective inhibitor of purified HRV-2 2A^{pro} activity with a K_i value of 0.3 μ M, which is about 20 times lower than that of the CBV 2A^{pro} inhibitor z-IETD-fmk ($K_i = 7.7 \mu$ M) (1) and the caspase inhibitor z-VAD-fmk, which is also active against HRV 2A^{pro} ($K_i = 5.6 \mu$ M) (5). Then we showed that z-LVLQTM-fmk specifically inhibited HRV-2 replication *in vitro* in A549 cells but also *in vivo* in BALB/c mice. The mouse model has features very similar to those observed in rhinovirus infection in humans, including augmentation of allergic airway inflammation (2), and to our knowledge, our study is the first one to validate *in vivo* in mice an antiviral drug directed against HRV. Mouse infection by HRV-2 was made possible by the fact that this virus strain, which belongs to the minor HRV group, uses a member of the low-

density-lipoprotein receptor family and can bind the mouse counterpart. Moreover, direct injection of the peptide by the intranasal route in mice several hours after infection prefigures the outline for administration of a drug that could be used in humans for efficient anti-HRV therapy.

On the basis of HRV-2 2A^{pro} crystallographic data, a virtual docking model was then proposed to predict the inhibitor binding mode into the ligand binding pocket of the enzyme. Sequence comparison between different 2A^{pro} enzymes from HRV-A, -B, and -C species revealed that amino acid residues involved in the interaction with the inhibitor in our model are relatively well conserved.

The alignment of 40 HRV-A 2A^{pro} sequences (Fig. 9A) shows that for eight serotypes analyzed, Ile96 is replaced by a Leu, which displays the same physicochemical properties and so likely mediates the same hydrophobic interactions with P4 Leu. Interestingly, Asp125 found in 10 serotype sequences is replaced by a Glu, whose longer side chain may enhance a major interaction with P5 Val. Concerning the 25 HRV-B 2A proteins analyzed (Fig. 9B), hydrophobic interactions with P4 Leu are conserved through hydrophobic residues Ile, Leu, and Val at position 78. Ser83, which appears to be crucial for interaction with P3 Gln, is poorly conserved in type B sequences, as a Gly and an Asn are found at 50% and 35%, respectively. The second highlighted interaction through Asp125 also seems to be weakened in type B, as a serine is generally found at this position. Basic residues Arg and Lys are found at position 96, probably changing interaction modalities with the hydrophobic P4 Leu; nevertheless, the peptide LVLQTM seems to well accommodate in the catalytic cleft, even though a Lys is found at position 96 in HRV-B14. On the other hand, the Cys at position 129 (A129 in HRV-A2 2A^{pro}) found in all type B sequences may reinforce the hydrophobic interaction with P4 Leu. Finally, I80V, S83T, I96L, C101A, and D125E mutations occurring in only a few type C sequences (Fig. 9C) should have no detrimental effects on the interaction between the enzyme and its inhibitor, as they represent conservative mutations from a physicochemical point of view.

If our peptide inhibitor may be of general use against all HRV serotypes, its use for therapeutic purposes could be extended to other enterovirus-associated diseases since it is also active against poliovirus 1 (PV-1; GenBank accession number [VO1149](#)) and human enterovirus 71 (HEV-71; GenBank accession number [AEF32490](#)) 2A proteases (data not shown). Comparison of the sequences of these proteases with those of other proteases tested in this study for their interaction with LVLQTM reveals only minor differences (Fig. 10). In particular, S5 Gln81 is present in EV-6, while a similar glutamate is found in the other viruses. Asp125 properties are conserved through the glutamate or the asparagine in EV-6 and PV-1 or HEV-71, respectively. The serine at the same position in HRV-B14 with a side chain shorter than Asp and obviously shorter than Glu may reflect some flexibility of the substrate at P5, where it is largely solvent exposed (Fig. 5A). The apolar depression defining S4 is conserved, as all residues at positions 78, 80, 96, and 129, even though they are not similar, are hydrophobic, except for PV-1 at Gln78 and HRV-B14 at Lys96. Glu82 and Gly123 at S3 are not well conserved, but peptide interactions occur through their backbone; this would not have any consequences on affinity. Tyr85 and Ser83 are strictly conserved at S2, except PV-1 displays a glutamine at position 83. Finally, the flat and narrow pocket displaying very good chemical complementarities to the P1 Met side chain is well conserved among the different viruses, as residues 101 to 106 and 122 to 124 as well as Tyr85 are homologous. Therefore, this model allows accurate prediction of the interaction of the peptide inhibitor with a large spectrum of 2A proteases. This model also suggests affinity differences between enteroviral 2A proteases for the LVLQTM peptide. In particular, the longer side chain of S4 I80 and S4 I96 in the HRV-2 2A protease compared to S4 V80 and S4 L96 in EV-6 2A^{Pro} (Fig. 10) might reinforce the Van der Waals interactions with the P4 L in the peptide inhibitor. Moreover, the presence of a hydrophobic cysteine 101 at position S1 in HRV-2 2A^{Pro} instead of a polar serine in EV-6 2A^{Pro} likely strengthens the interaction with the P1 methionine in the peptide inhibitor. Such predictions could thus account for the better affinity of HRV-2 2A^{Pro} for the LVLQTM peptide compared to the EV-6 2A^{Pro}, as confirmed by our experimental data (compare Fig. 5a and d).

From a more fundamental point of view, this study also highlights several clues concerning the exact role, if any, played by the RBM6Δ6 protein in the context of virus-infected cells. One possibility is that RBM6Δ6 is an antidote molecule which is expressed by the cell in response to viral infection and which specifically neutralizes protein poison 2A^{Pro}. Conversely, and more likely, binding of the protease on RBM6Δ6 could have a more or less profound impact on normal function of this protein in favor of viral infection. Experiments are under way to try to resolve this new and very exciting enigma.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Monique Ballandras for technical assistance as well as Leslie C. Sutherland and Sophie Bonnal for providing a plasmid encoding the full-length RBM6 protein.

This project was supported by the National Reference Center of Enteroviruses, the Institut de Veille Sanitaire, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR; to Béatrice Riteau).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

We declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Badorff C, et al. 2000. Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue. *J. Biol. Chem.* 275:11191–11197.
2. Bartlett NW, et al. 2008. Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nat. Med.* 14:199–204.
3. Belov GA, et al. 2000. Early alteration of nucleocytoplasmic traffic induced by some RNA viruses. *Virology* 275:244–248.
4. Deszcz L, Cencic R, Sousa C, Kuechler E, Skern T. 2006. An antiviral peptide inhibitor that is active against picornavirus 2A proteinases but not cellular caspases. *J. Virol.* 80:9619–9627.
5. Deszcz L, Seipelt J, Vassilieva E, Roetzer A, Kuechler E. 2004. Antiviral activity of caspase inhibitors: effect on picornaviral 2A proteinase. *FEBS Lett.* 560:51–55.
6. Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P. 1997. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* 16:277–282.
7. Garcia-Calvo M, et al. 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 273:32608–32613.
8. Gouet P, Robert X, Courcelle E. 2003. ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 31:3320–3323.
9. Gustin KE, Sarnow P. 2002. Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus. *J. Virol.* 76:8787–8796.
10. Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE. 1999. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.* 73:718–727.
11. Jurgens CK, et al. 2006. 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology* 345:346–357.
12. Kempf BJ, Barton DJ. 2008. Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. *J. Virol.* 82:5847–5859.
13. Khoufache K, et al. 2009. Protective role for protease-activated receptor-2 against influenza virus pathogenesis via an IFN-gamma-dependent pathway. *J. Immunol.* 182:7795–7802.
14. Kistler A, et al. 2007. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *J. Infect. Dis.* 196:817–825.
15. König H, Rosenwirth B. 1988. Purification and partial characterization of poliovirus protease 2A by means of a functional assay. *J. Virol.* 62:1243–1250.
16. Laine P, Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. 2005. Phylogenetic analysis of human rhinovirus capsid protein VP1 and 2A protease coding sequences confirms shared genus-like relationships with human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 86:697–706.
17. Lamphear BJ, et al. 1993. Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human coxsackievirus and rhinovirus. *J. Biol. Chem.* 268:19200–19203.
18. Molla A, Hellen CU, Wimmer E. 1993. Inhibition of proteolytic activity of poliovirus and rhinovirus 2A proteinases by elastase-specific inhibitors. *J. Virol.* 67:4688–4695.
19. Ohlmann T, Rau M, Pain VM, Morley SJ. 1996. The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J.* 15:1371–1382.
20. Otto HH, Schirmeister T. 1997. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97:133–172.
21. Palmenberg AC, et al. 2009. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science* 324:55–59.
22. Papi A, et al. 2006. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173:1114–1121.
23. Park N, Katikaneni P, Skern T, Gustin KE. 2008. Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 82:1647–1655.
24. Petersen JF, et al. 1999. The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: a proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *EMBO J.* 18:5463–5475.

25. Prevot D, et al. 2003. Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO J.* 22:1909–1921.
26. Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating 50 per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493–497.
27. Sommergruber W, et al. 1994. 2A proteinases of coxsackie- and rhinovirus cleave peptides derived from eIF-4 gamma via a common recognition motif. *Virology* 198:741–745.
28. Sommergruber W, et al. 1992. Cleavage specificity on synthetic peptide substrates of human rhinovirus 2 proteinase 2A. *J. Biol. Chem.* 267: 22639–22644.
29. Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Moncorge O, Ohlmann T. 2007. Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res.* 35:e121.
30. Studier FW. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41:207–234.
31. Timmer T, et al. 1999. A comparison of genomic structures and expression patterns of two closely related flanking genes in a critical lung cancer region at 3p21.3. *Eur. J. Hum. Genet.* 7:478–486.
32. van Gunsteren WF. 1996. Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. vdf, Zürich, Switzerland.
33. Ventoso I, Barco A, Carrasco L. 1999. Genetic selection of poliovirus 2Apro-binding peptides. *J. Virol.* 73:814–818.
34. Vojtek AB, Hollenberg SM. 1995. Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* 255:331–342.
35. Zunszain PA, et al. 2010. Insights into cleavage specificity from the crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease complexed with a peptide substrate. *J. Mol. Biol.* 395:375–389.

Inhiber la réplication de l'enterovirus 71 humain en ciblant la protéase virale 2A

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Roland Montserret de l'équipe RMN et virus de l'hépatite C CNRS UMR 5086 et Sébastien Violot de l'équipe biocristallographie et biologie structurale des cibles thérapeutiques CNRS UMR 5086.

L'entérovirus 71 (EV-71), membre du genre Enterovirus, constitue un enjeu de santé publique majeur en Asie du sud-est où il est associé à de sévères complications neurologiques. Il n'existe actuellement aucun vaccin ou antiviral efficaces pour lutter contre ce virus. Le but de cette étude était donc de déterminer si le peptide LVLQTM qui a précédemment été caractérisé comme nouvel inhibiteur de la protéase 2A du RVH-A2 et inhibiteur de la réplication du RVH *in vitro* dans les cellules A549 et *in vivo* chez la souris, pouvait être utilisé contre tous les entérovirus et plus particulièrement contre l'EV-71 (Falah, Violot et al. 2011).

La première étape de notre étude a été de produire pour la première fois des formes solubles et actives de protéases 2A d'EV-71 chez *E.coli*. A cet effet, la souche SE1 d'*E.coli* B a été utilisée et la 2A^{pro} a été isolée à plus de 95 % de pureté par chromatographie d'affinité et chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (**Figure 1a**). La technologie combinée SEC-MALS a ensuite permis de montrer que la 2A^{pro} de l'EV-71 se comporte essentiellement comme un monomère de masse moléculaire 17,7 kDa (**Figure 1b**) ce qui constitue une caractéristique commune à d'autres 2A^{pro} d'entérovirus comme il a été décrit pour les 2A^{pro} de CVB4 et RVH-B14 (Wang, Johnson et al. 1998; Seipelt, Liebig et al. 2000).

La capacité du peptide LVLQTM à se comporter comme un analogue de substrat de la protéase 2A de l'EV-71 a ensuite été évaluée en utilisant essentiellement les mêmes approches que celles décrites précédemment (Falah, Violot et al. 2011). En particulier, le site hybride LVLQTM-G a été inséré dans la luciférase recombinante du système Protease-GloTM (Promega). Cette séquence a été choisie pour reconstituer un site de clivage de la 2A^{pro} de l'EV-71, avec les résidus LVLQTM correspondant aux résidus P1

à P6 et la glycine correspondant à la position P1' (une glycine se trouvant à cette position dans l'authentique site de clivage de la polyprotéine de l'EV-71 par la 2A^{pro}). Dans cette configuration, la luciférase était inactive et le clivage du site inséré conduisait à l'activation de la luciférase et à l'émission de lumière en présence de substrat (**Figure 1c**). Comme le montre la **Figure 1c**, la luciférase a été activée après digestion de la séquence LVLQTM-G par la 2A^{pro} d'EV-71. Ce clivage était spécifique puisqu'aucune activité n'a été mesurée en présence de la protéine luciférase contenant la séquence peptidique ENLYFQ-S, site de clivage de la protéase TEV. Ce résultat montrait que le peptide LVLQTM représentait, comme pour la 2A^{pro} du RVH-A2, un pseudo-substrat de la 2A^{pro} de l'entérovirus 71.

Les caractéristiques thermodynamiques de l'interaction entre la protéase 2A de l'EV-71 et le peptide LVLQTM ont ensuite été déterminées par microcalorimétrie (**Figure 1d**). Nous avons ainsi démontré que le peptide LVLQTM se liait à la 2A^{pro} avec une constante de dissociation (Kd) de 9,6 μ M. De plus, le peptide semblait établir des liaisons hydrogène et des interactions de Van der Waals étroites et son positionnement dans la poche de liaison au substrat de la 2A^{pro} impliquait peu de changements conformationnels.

La capacité de ce peptide à inhiber la protéase 2A de l'EV-71 a ensuite évaluée. Comme il l'avait déjà été démontré, l'ajout des groupements benzyloxycarbonyl (z) et fluorométhylcétone (fmk) aux extrémités N- et C-terminales respectivement renforçait le pouvoir inhibiteur du peptide et pour cette raison nous avons utilisé sa forme modifiée z.LVLQTM.fmk pour la suite de cette étude. L'activité de la 2A^{pro} de l'entérovirus 71 a été déterminée par un test *in cellulo* qui reposait sur la capacité de cet enzyme à cliver le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Hambidge and Sarnow 1992). Des cellules HeLa ont été (i) inoculées pendant 1 h avec le peptide contrôle z.FA.fmk ou le peptide z.LVLQTM.fmk à une concentration de 100 μ M et transfectées (ii) pendant 2 h avec un ARNm coiffé et polyadénylé codant pour la 2A^{pro} du l'EV-71 ou la protéine GFP (contrôle), et enfin (iii) pendant 3 h avec un ARNm rapporteur codant pour luciférase Renilla (R-Luc) et contenant soit la séquence 5'UTR du gène de la β -globine (ARNm coiffé, Cap-R-Luc) soit la séquence IRES de l'EMCV (ARNm non

coiffé, IRES-R-Luc). Nous avons ainsi démontré (**Figure 2a**) que l'inhibition de l'activité de la luciférase Cap-R-Luc par la 2A^{pro} de l'EV-71, mesurée en présence du peptide z.FA.fmk, a été complètement bloquée en présence du peptide z.LVLQTM.fmk. De la même façon, l'augmentation de la traduction des ARNm IRES observée en présence de la 2A^{pro} de l'EV-71 a été inhibée lorsque les cellules ont été traitées avec le peptide z.LVLQTM.fmk.

Nous avons également testé l'effet inhibiteur du z.LVLQTM.fmk sur l'infection de cellules HeLa par l'EV-71 et avons démontré qu'il était capable de réduire significativement le pouvoir réplcatif de ce virus et avait d'autant plus d'effets quand ajouté plusieurs heures post-infection (**Figure 2b**).

Enfin, les séquences des protéases 2A de 40 souches d'EV-71 différentes ont été comparées pour évaluer la capacité du peptide LVLQTM à inhiber chacune d'entre elles (**Figures 2c et S1**). Cette analyse a révélé que seules 22 positions étaient sujettes à des mutations ponctuelles. Parmi elles, 4 mutations étaient positionnées dans la poche de fixation du substrat comme définie pour la protéase 2A du RVH-A2 mais aucune d'entre elles ne semblait affecter le positionnement et la fixation du peptide LVLQTM dans la poche des différentes protéases 2A d'entérovirus 71 (Falah, Violot et al. 2011). Ce modèle suggérait donc que le peptide LVLQTM est capable d'inhiber potentiellement l'ensemble des 2A^{pro} d'EV-71 décrites jusqu'à présent.

Blocking human enterovirus 71 replication by targeting viral 2A protease

Nisrine Falah¹, Roland Montserret², Virginie Lelogeais¹, Isabelle Schuffenecker³, Bruno Lina^{1,3}, Jean-Claude Cortay¹ and Sébastien Violot^{4*}

¹VirPath, Virologie et Pathologie Humaine, EA4610, Université Lyon 1, Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Est, secteur Laennec, Rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon cedex 08, France; ²NMR and Hepatitis C Virus, Unité Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, UMR 5086 CNRS—Université Claude Bernard Lyon 1, IBCP FR 3302-7, Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France; ³Laboratoire de Virologie, Hospices Civils de Lyon, 59 boulevard Pinel, F-69677 Bron cedex, France; ⁴Biocrystallography and Structural Biology of Therapeutic Targets, Unité Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, UMR 5086 CNRS—Université Claude Bernard Lyon 1, IBCP FR 3302-7, Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France

*Corresponding author. Tel: +33-4-37-65-29-04; Fax: +33-4-72-72-26-16; E-mail: sebastien.violot@ibcp.fr

Received 18 April 2012; returned 2 June 2012; revised 6 July 2012; accepted 9 July 2012

Objectives: Human enterovirus 71 (EV-71), a member of the Enterovirus genus, constitutes a major public health issue in the Asia-Pacific region, where it is associated with several severe neurological complications. There is currently no effective vaccine or antiviral against EV-71. The aim of this study was to determine whether the six amino acid peptide LVLQTM, which was previously shown to inhibit human rhinovirus (HRV) 2A protease (2A^{Pro}) activity *in vitro* and HRV replication *in vivo* in mice, could be of more general use against enteroviruses and more particularly against EV-71.

Methods: To investigate whether the LVLQTM peptide was a pseudosubstrate of EV-71 2A^{Pro}, a recombinant luciferase containing the LVLQTM sequence was designed so that recognition of this sequence by 2A^{Pro} led to luciferase activation. Direct interaction between EV-71 2A^{Pro} and the LVLQTM peptide was further confirmed by isothermal titration calorimetry. We then tested the effects of the peptide on EV-71 2A^{Pro} cleavage activity and EV-71 replication in HeLa cells.

Results: We showed that the LVLQTM peptide behaved as an effective substrate analogue of EV-71 2A^{Pro}, which binds into the active site of the protease with a dissociation rate constant of 9.6 μ M. Moreover, LVLQTM significantly inhibited eIF4G cleavage activity of 2A^{Pro} as well as EV-71 replication in HeLa cells.

Conclusions: This study demonstrates that the LVLQTM peptide that has previously been shown to inhibit HRV replication is also an effective inhibitor of EV-71 2A^{Pro} and therefore of EV-71 replication, opening new doors in the development of new antivirals against EV-71.

Keywords: picornavirus, antiviral, inhibitory peptide, cysteine protease

Introduction

Human enterovirus 71 (EV-71), a member of the Enterovirus genus, is a causative agent of hand, foot and mouth disease, aseptic meningitis, brainstem encephalitis and poliomyelitis-like acute flaccid paralysis.¹ EV-71 is the most pathogenic non-polio enterovirus in the Asia-Pacific region, where several outbreaks have been reported. The largest EV-71 epidemic so far occurred in 1998 in Taiwan, where ~1.5 million people and >100 000 children were infected. Among them, 405 severe cases of neurological and cardiopulmonary complications were described, of which 78 were fatal.¹ Moreover, the latest large Asian epidemic

was in China in 2008, where ~490 000 infections and 126 deaths in children were reported.² There is no effective vaccine against EV-71 available on the market, despite the investigation of various types of vaccines, including inactivated whole virus, live-attenuated, subviral particle and DNA vaccines.^{3,4} In addition, several antiviral strategies have been employed, including compound library screening and revisiting of some antivirals developed against poliovirus and rhinovirus, but none of them has been approved yet. The lack of vaccine or antiviral options against EV-71 remains a worrying situation, as EV-71 has been found to circulate endemically. Thus, the aim of this study was to describe a new inhibitor of EV-71 infection.

We previously showed that some peptide ligands that were selected from a human placenta cDNA library by the yeast two-hybrid procedure inhibited the activity of the human rhinovirus (another member of the Enterovirus genus) 2A protease (2A^{Pro}) by docking into the active site of the enzyme.⁵ Among them, the dominant peptide LVLQTM was also shown to inhibit subsequent viral replication *in vitro* in A549 cells and *in vivo* in mice, and could therefore be an interesting lead compound for a therapeutic agent against rhinoviruses. In the present study, we demonstrated that the LVLQTM peptide is also a strong inhibitor of EV-71 2A^{Pro} cleavage activity as well as EV-71 replication, opening new prospects in the development of anti-EV-71 drugs.

Materials and methods

Most protocols used in this study have already been described in detail in Falah et al.⁵ Specific methods are detailed in Supplementary data (available at JAC Online).

Results and discussion

Expression and purification of EV-71 2A^{Pro}

Production of soluble and active EV-71 2A^{Pro} in the cytoplasm of *Escherichia coli* was achieved through the Staby plasmid system (Eurogentec). Purification of the 2A protein from the cell extract was achieved by metal-chelate affinity chromatography followed by size-exclusion chromatography (SEC). The SEC elution profile depicted in Figure 1(a) shows that EV-71 2A^{Pro} (peak D1) was purified to >95% purity, as estimated by SDS-PAGE analysis. However, the enzyme presented very abnormal chromatographic behaviour, since it was eluted very late from the SEC column together with the salt, which made it impossible to accurately determine its molecular weight using column calibration. To resolve this problem, the combined technology SEC-multiangle light scattering (SEC-MALS) was used. This analysis, presented in Figure 1(b), revealed that 2A^{Pro}, which eluted in a main peak from 17.0 to 18.8 mL, had a calculated molecular mass of 17.7 kDa and thus behaved essentially as a monomer. Noticeably, this monomeric organization is very similar to that of other 2A^{Pro}, as previously described for Coxsackie virus B4 (CVB4) and human rhinovirus B14 (HRV-B14) 2A^{Pro}, which also behave as monomers.^{6–8}

The LVLQTM peptide is a pseudosubstrate of EV-71 2A^{Pro}

The ability of the LVLQTM peptide to act as a pseudosubstrate of EV-71 2A^{Pro} was evaluated *in vitro* in the Protease-GloTM Assay (Promega). In this assay, the LVLQTM-G peptide was inserted in frame into the linker region of the GloSensorTM luciferase. This sequence was chosen to reconstruct a potent site of cleavage by the protease, with LVLQTM corresponding to P1–P6 residues on the N-terminal side of the scissile bond and glycine corresponding to the P1' residue, as this amino acid is found in the equivalent position in the authentic *cis*-cleavage site of the EV-71 polyprotein. As shown in Figure 1(c), significant activation of the luciferase containing the LVLQTM-G sequence was detected when incubation was performed in the presence of EV-71 2A^{Pro}. This cleavage was specific, since no luminescence was measured when using a luciferase protein containing the

peptide sequence ENLYFQ-S, which was only cut by the TEV protease (positive control).

Measuring LVLQTM peptide binding to EV-71 2A^{Pro} by isothermal titration calorimetry

We used isothermal titration calorimetry to investigate the interaction between EV-71 2A^{Pro} and the LVLQTM peptide (Figure 1d). The results showed that the binding was exothermic and analysis of the data yielded a dissociation constant (K_d) of 9.6 μ M. Concerning thermodynamic parameters, binding of LVLQTM to EV-71 2A^{Pro} was associated with favourable entropy ($\Delta S = 19.7$ cal/mol/deg, i.e. $T\Delta S = 5.8$ kcal/mol) and favourable enthalpy ($\Delta H = -956$ cal/mol). The favourable enthalpy indicated that the peptide established tight interactions through hydrogen bonds and Van der Waals contacts, and that these interactions were strong enough to compensate for the unfavourable enthalpy associated with desolvation. On the other hand, the highly favourable entropy showed that the binding mainly involved hydrophobic interactions and was consistent with the displacement of water molecules from the active site and/or peptide hydration shell. Moreover, this high $T\Delta S$ value, indicating that the interaction between EV-71 2A^{Pro} and the LVLQTM peptide was predominantly entropic, might also reflect low conformational entropy change, as a consequence of the loss of conformational degrees of freedom of both the drug molecule and the protein molecule upon binding.

Taken together, these results demonstrated that the LVLQTM peptide exhibits an overall conformation that fits well with the substrate-binding pocket of EV-71 2A^{Pro} and may thus represent a potent inhibitor of this enzyme.

LVLQTM peptide inhibits eIF4G-cleavage activity of EV-71 2A^{Pro}

We then investigated the effects of the LVLQTM peptide on 2A^{Pro} activity in a cellular system. Based on our previous results, the benzyloxycarbonyl-LVLQTM-fluoromethylketone (z-LVLQTM-fmk) was preferably used in an *in cellulo* cleavage assay that relied on the ability of the EV-71 2A^{Pro} to hydrolyse the initiation factor of translation, eIF4G.⁷ The results depicted in Figure 2(a) indicated that EV-71 2A^{Pro}-induced inhibition of cap-R-luciferase activity in the presence of the control peptide z-FA-fmk was completely dismissed in the presence of z-LVLQTM-fmk. Similarly, EV-71 2A^{Pro}-induced enhancement of internal ribosome entry site (IRES)-R-luciferase activity was inhibited when cells were treated with z-LVLQTM-fmk. Altogether, these results demonstrated that z-LVLQTM-fmk specifically inhibited EV-71 2A^{Pro} activity in HeLa cells.

z-LVLQTM-fmk peptide inhibits EV-71 replication

To investigate whether the z-LVLQTM-fmk peptide could inhibit EV-71 replication, HeLa cells were infected with EV-71 (multiplicity of infection=1) and treated with 200 μ M z-FA-fmk or z-LVLQTM-fmk at different times before and after infection. Total virus titres were determined 24 h post-infection. As indicated in Figure 2(b), the presence of z-LVLQTM-fmk reduced virus multiplication by >50-fold when cells were infected and treated at the same time. Noticeably, delayed administration of the peptide at 2 and 4 h post-infection had a more

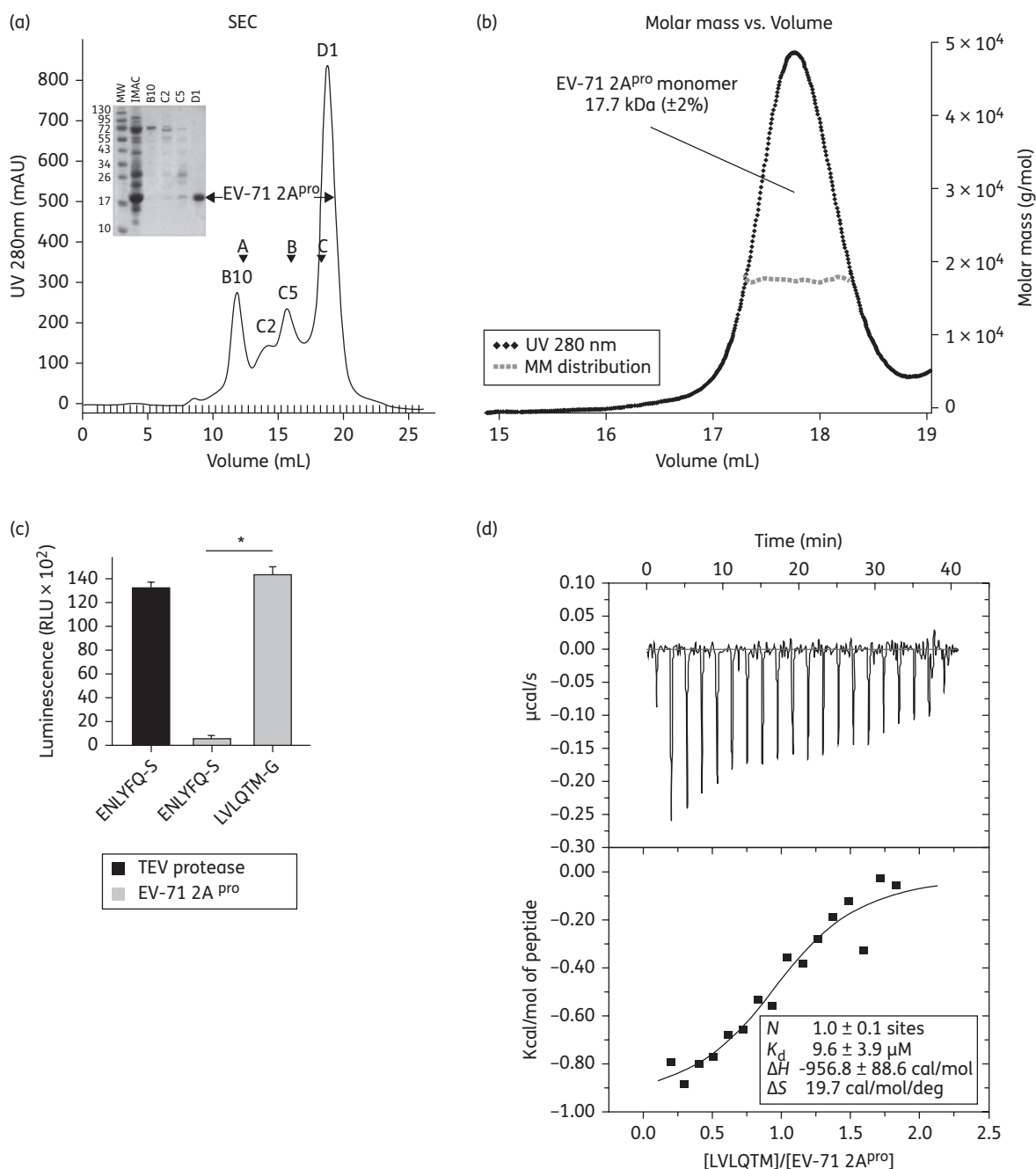


Figure 1. Characterization of the interaction between EV-71 2A^{pro} and the LVLQTM peptide. (a) Purification of recombinant EV-71 2A^{pro}. After partial purification by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), pooled fractions enriched in 2A^{pro} were further fractionated on a Superdex™ 200 column. The column was equilibrated with a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol, and calibrated with ferritin (A, 440 kDa), ovalbumin (B, 43 kDa) and ribonuclease A (C, 13.7 kDa). Insert, SDS-PAGE analysis of the SEC fractions stained with Coomassie brilliant blue. (b) SEC-MALS analysis of EV-71 2A^{pro}. SEC elution pattern and molar mass (MM) plot. 500 μL of 0.7 mg/mL EV-71 2A^{pro} eluted at a different retention time than in SEC. The weight-averaged molecular mass determined by MALS corresponds to a monomer of EV-71 2A^{pro} for the peak at 17.8 mL elution volume. (c) Protease-Glo™ Assay in the presence of EV-71 2A^{pro}. *In vitro*-synthesized GloSensor ENLYFQ-S and GloSensor LVLQTM-G proteins were incubated with purified TEV protease or EV-71 2A^{pro} for 45 min. Luminescence was measured using a luminometer after addition of Bright-Glo assay reagent for 5 min. RLU, relative light units. Data are expressed as the means of three independent experiments and standard deviations are indicated. The asterisk indicates $P < 0.05$. (d) Isothermal titration calorimetry for the interaction of EV-71 2A^{pro} and LVLQTM peptide. The upper panel shows a thermogram, and the lower panel shows the corresponding binding isotherm and best-fitted curve. Stoichiometry (N), dissociation constant (K_d), binding enthalpy (ΔH) and binding entropy (ΔS) were calculated, and are presented as an inset in the lower panel.

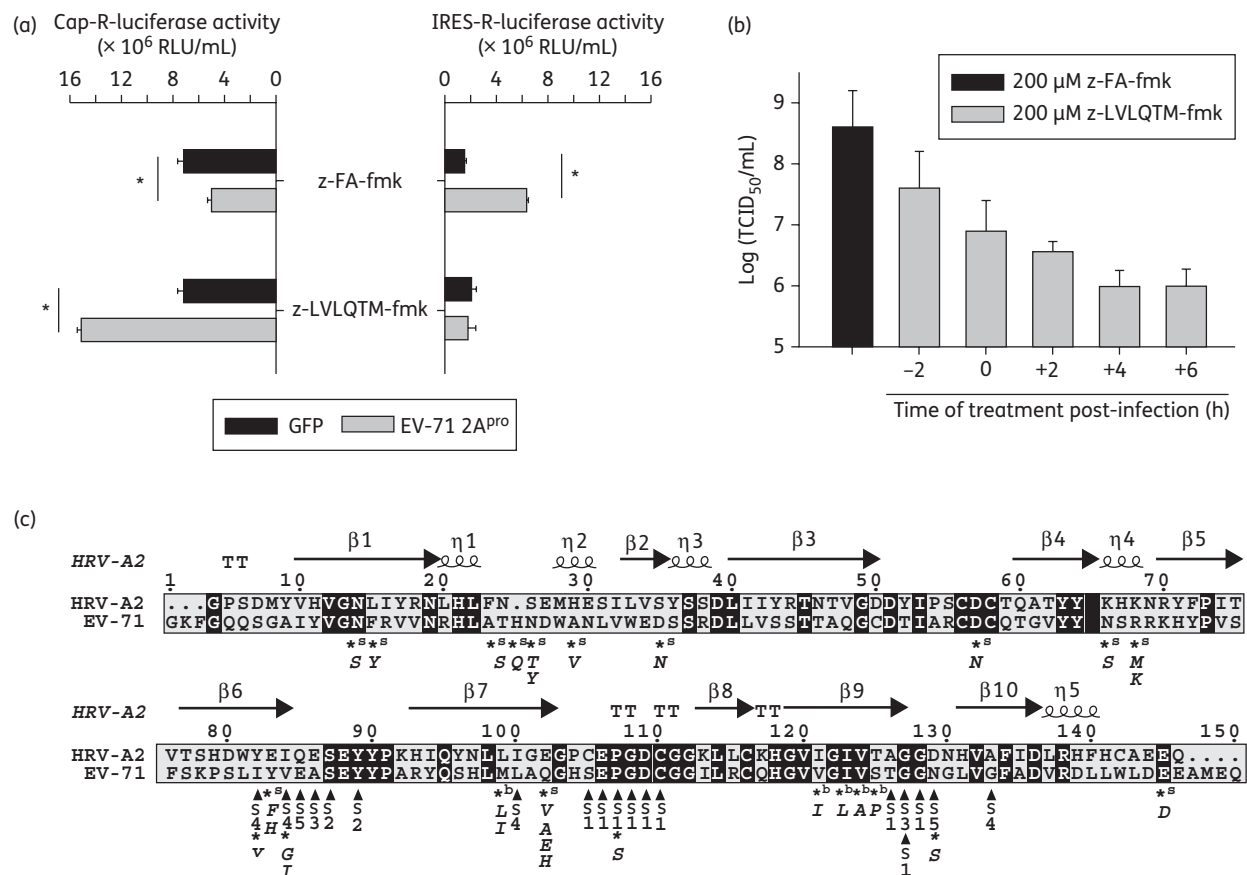


Figure 2. The z-LVLQTM-fmk peptide inhibits EV-71 2A^{pro} activity and EV-71 replication in HeLa cells. (a) z-LVLQTM-fmk impairs EV-71 2A^{pro}-mediated inhibition of capped mRNA translation. HeLa cells were treated with 100 μM z-LVLQTM-fmk or z-FA-fmk for 1 h and were subsequently transfected with an mRNA coding for EV-71 2A^{pro} or green fluorescent protein (GFP) for 2 h. Cells were then transfected for 3 h with a capped mRNA or an IRES-containing mRNA, both coding for the *Renilla* luciferase. The first contained the 5' untranslated region (UTR) of the β-globin gene and the second contained the 5' UTR of the encephalomyocarditis virus RNA. Cells were then lysed and luciferase activity was measured by luminometry. Error bars denote the standard deviations from the mean values obtained from three independent experiments. (b) z-LVLQTM-fmk inhibits EV-71 replication. HeLa cells were infected with EV-71 at a multiplicity of infection of 1 and treated with 200 μM z-LVLQTM-fmk or z-FA-fmk at different times before and after infection. Virus titres were determined 24 h post-infection. (c) Sequence alignments of HRV-A2 (GenBank accession number X02316) and EV-71 2A^{pro} (GenBank accession number AEF32490). Sequence alignment was performed using the ClustalW program and plotted with the ESPrpt program. Similar residues are highlighted in grey and identical residues are in black. Secondary structure elements of HRV-A2 2A^{pro} are shown above the sequences, arrows indicate residues involved in the binding of the VLQTM peptide at subsites S5–S1 in HRV-A2 2A^{pro} and stars indicate point mutations in 2A^{pro} found for 40 EV-71 strains (see Figure S1 available as Supplementary data at JAC Online for GenBank accession number). The s- and b-marked stars represent surface residues and buried residues, respectively. Residues are numbered according to the amino acid sequence of EV-71 2A^{pro}.

pronounced inhibitory effect on virus replication, since the viral titre dropped by ~107- and 417-fold, respectively.

In summary, the LVLQTM peptide, which was previously characterized as a new inhibitor of HRV 2A^{pro}, also impairs EV-71 2A^{pro} activity. These results are consistent with the comparison of the sequences of these proteases, which revealed minor differences in the nature of their substrate-binding pocket residues.⁵

LVLQTM peptide represents a potential inhibitor of multiple EV-71 2A^{pro} variants

The 2A^{pro} sequences from 40 EV-71 strains were compared to evaluate whether the LVLQTM peptide could be of general use

against different EV-71 genotypes. Genotyping of EV-71 has so far been based on structural genes VP1 and VP4. Recently, Chan *et al.*⁹ proposed a new classification into four genotypes, A–D, based on EV-71 complete genomes (taking into account 2A^{pro} variants). Point mutations occur at 22 positions along the 2A^{pro} sequence (Figure 2c and Figure S1 available as Supplementary data at JAC Online). More than half are located on the surface of the protease and are unlikely to interfere with LVLQTM binding. Five mutations are buried and only mutation S125P found for the SHZH98 strain may induce local or long-range conformational rearrangement. More interestingly, four mutations occur at particular positions corresponding to substrate-binding pocket residues defined for HRV-A2 2A^{pro}.⁵ In

particular, the S5 Asn129 residue is extremely conserved among nearly all EV-71 serotypes analysed in this study and is consistent with the presence of an aspartate in HRV-A2 or a glutamate in EV-6 and poliovirus-1. Only EV-71 strain BrCr displays a serine at this position. The shorter side chain of serine compared with that of aspartate or asparagine likely reflects some flexibility of the substrate at P5. This could suggest a lesser affinity of this strain for the LVLQTM peptide, as previously shown for HRV-B14 displaying also a serine at position 129.⁵ The apolar depression defining S4 is maintained, as mutations I82V and V84G/I are both conservative. Finally, mutation P107S in strain MS742387 occurs at S1 in a very well conserved stretch of residues. HRV-B14 2A^{Pro}, which also displays a mutation at this position (proline to leucine), is still inhibited by LVLQTM, suggesting that the peptide nonetheless inhibits strain MS742387.

The general conclusion from these analyses supports the view that the peptide inhibitor LVLQTM may interact with a large spectrum of EV-71 2A^{Pro}s, especially from subgenotypes B4, B5, C1, C2, C5 and D currently circulating in the world and associated with severe CNS infection of young children.

Funding

This project was supported by the National Reference Center of Enteroviruses in France.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Figure S1 and more details of the methods are available at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- 1 Lin TY, Chang LY, Hsia SH *et al.* The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management. *Clin Infect Dis* 2002; **34** Suppl 2: S52–7.
- 2 Zhang Y, Zhu Z, Yang W *et al.* An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China. *Viol J* 2010; **7**: 94.
- 3 Chung YC, Ho MS, Wu JC *et al.* Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine* 2008; **26**: 1855–62.
- 4 Tung WS, Bakar SA, Sekawi Z *et al.* DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet Vaccines Ther* 2007; **5**: 6.
- 5 Falah N, Violot S, Decimo D *et al.* *Ex vivo* and *in vivo* inhibition of human rhinovirus replication by a new pseudosubstrate of viral 2A protease. *J Virol* 2011; **86**: 691–704.
- 6 Liebig HD, Ziegler E, Yan R *et al.* Purification of two picornaviral 2A proteinases: interaction with eIF-4 γ and influence on *in vitro* translation. *Biochemistry* 1993; **32**: 7581–8.
- 7 Baxter NJ, Roetzer A, Liebig HD *et al.* Structure and dynamics of coxsackievirus B4 2A proteinase, an enzyme involved in the etiology of heart disease. *J Virol* 2006; **80**: 1451–62.
- 8 Wang QM, Johnson RB, Cox GA *et al.* Enzymatic characterization of refolded human rhinovirus type 14 2A protease expressed in *Escherichia coli*. *J Virol* 1998; **72**: 1683–7.
- 9 Chan YF, Sam IC, AbuBakar S. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect Genet Evol* 2010; **10**: 404–12.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Le rhinovirus est la première cause virale d'infections des voies respiratoires supérieures et inférieures. Ni antiviraux ni vaccins ne sont actuellement disponibles pour lutter contre la centaine de RVH identifiés. Dans ce contexte de vide thérapeutique, nous avons recherché de nouvelles molécules inhibitrices de la réplication des rhinovirus et avons plus particulièrement ciblé la protéase 2A du RVH qui joue un rôle clé au cours du cycle d'infection viral.

Dans notre étude, la 2A^{pro} du RVH-A2 a servi de protéine appât pour cribler une banque d'ADN complémentaires de placenta humain. Ce crible a permis d'identifier dix polypeptides présentant tous un motif séquentiel commun à leur extrémité C-terminale du type L-X-L-X-T/N- ϕ où X désigne un acide aminé quelconque et ϕ un acide aminé hydrophobe. Les peptides ainsi sélectionnés mimaient le demi-site de clivage de plusieurs substrats naturels de la 2A^{pro} se comportant ainsi comme de véritables pseudosubstrats de l'enzyme. Parmi eux, le peptide LVLQTM qui correspondait à l'extrémité C-terminale de la protéine cellulaire RBM6 Δ 6 (de fonction inconnue) présentait la plus forte affinité pour la 2A^{pro} du RVH-2 et inhibait l'activité de l'enzyme viral avec une constante d'inhibition (K_i) de 10 μ M. Ce peptide a été modifié sous la forme benzyloxycarbonyl.LVLQTM.fluorométhylcétone (z.LVLQTM.fmk) pour favoriser son passage à travers la membrane plasmique des cellules humaines grâce à la présence du groupement fonctionnel « z » et pour former un lien covalent avec la cystéine du centre actif de la protéase 2A du fait de la modification « fmk ». Le peptide z.LVLQTM.fmk inhibait de manière irréversible la protéase virale avec un K_i de 0,3 μ M *in vitro* et présentait ainsi une affinité vis-à-vis de l'enzyme au moins 10 fois supérieure à celle des autres inhibiteurs peptidiques covalents décrits à ce jour (**Tableau 6**). Ce gain d'affinité pouvait s'expliquer au moins en partie par : (i) la présence d'une méthionine à l'extrémité C-terminale du peptide LVLQTM connue pour renforcer l'interaction de l'inhibiteur avec la protéase cible (Deszcz, Cencic et al. 2006). En effet, il a été démontré que dans le composé z.VAD.fmk (un inhibiteur de caspases également capable d'inhiber l'activité des 2A^{pro} du RVH et du CBV4), l'ajout d'un groupement

méthyl ester sur l'aspartate en position P1 ou le remplacement de cette dernière par une méthionine permettaient de renforcer sa spécificité vis-à-vis des protéases virales 2A, (ii) la nature mais aussi la longueur de la séquence en acides aminés de l'inhibiteur. Nous avons montré en particulier que l'hexapeptide LVLQTM présentait une meilleure affinité pour la 2A^{pro} que son homologue térapeptidique LQTM (Falah, Violot et al. 2011), les résidus présents aux positions P5 et P6 semblant renforcer les interactions avec les résidus situés dans la poche de fixation du substrat. Il est à noter que la plupart des inhibiteurs peptidiques de la 2A^{pro} décrits avant cette étude étaient des tri ou des térapeptides (**Tableau 6**).

Nous avons montré par ailleurs que le peptide z.LVLQTM.fmk inhibait la réplication des virus RVH-2 et RVH-14 dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 ainsi que la réplication du RVH-2 dans un modèle murin *in vivo*. Au cours de ces dernières expériences, nous n'avons relevé aucune perte de poids ni aucune mortalité particulière des animaux traités par l'inhibiteur. Cependant, des tests s'étalant sur plusieurs semaines devront être réalisés pour évaluer de manière plus précise la toxicologie de l'inhibiteur chez l'animal.

Nous avons également modélisé la fixation du peptide LVLQTM dans la poche de liaison du substrat de la protéase 2A du RVH-A2 pour tenter d'identifier les résidus de la 2A^{pro} qui interagissent avec le peptide inhibiteur. De manière intéressante, ces résidus sont relativement bien conservés au sein des RVH-A, -B et -C élargissant potentiellement le spectre d'action de l'inhibiteur à l'ensemble des 2A^{pro} des rhinovirus. Pour valider ce modèle, il serait particulièrement intéressant de déterminer la structure du complexe formé entre le peptide LVLQTM et la 2A^{pro} du RVH. Les premiers essais de cristallogénèse des 2A^{pro} du RVH-2 et de l'EV-71 entrepris au sein du laboratoire de Biocristallographie et Biologie Structurale des Cibles Thérapeutiques à Lyon (CNRS UMR 5086) se sont principalement heurtés à des problèmes d'agrégation et de polydispersité des protéines recombinantes utilisées à une concentration de l'ordre de 1,25 mM environ. Cependant, nous avons bon espoir de franchir cette étape assez rapidement en tentant de reproduire point par point les conditions de cristallogénèse de la 2A^{pro} du RVH-2 qui ont été publiées précédemment (Petersen, Cherney et al. 1999). A terme, la connaissance précise des interactions moléculaires qui s'établissent au sein

du complexe 2A^{pro}-inhibiteur devrait nous permettre de modifier chimiquement le peptide de base LVLQTM pour renforcer son interaction avec l'enzyme viral et de concevoir par une approche de drug design une petite molécule médicament mimant ces interactions.

De manière intéressante, il semble que les effets du peptide z.LVLQTM.fmk peuvent être élargis à d'autres membres du genre entérovirus. Nous avons montré que ce peptide inhibe aussi les 2A^{pro} de l'entérovirus 71 et du poliovirus 1 et par voie de conséquence la réplication de ces virus *in vitro* (les expériences mettant en jeu le poliovirus 1 ont été réalisées dans l'unité de Biologie des Virus Entériques, INSERM U994). Ces résultats sont particulièrement encourageants du fait qu'il n'existe pas actuellement d'antiviral efficace contre ces virus et que l'EV-71 est devenu beaucoup plus agressif dans les pays asiatiques où il a déjà provoqué des épidémies de grande ampleur. De plus, le poliovirus sauvage persiste dans 4 pays (Afghanistan, Inde, Nigeria et Pakistan) malgré une campagne mondiale d'éradication menée par l'OMS. Sans compter que plusieurs problèmes sont associés au vaccin lui-même. En effet, les souches atténuées utilisées dans le vaccin oral peuvent recouvrir un phénotype neurovirulent et ainsi entraîner des poliomyélites paralytiques associées à la vaccination. Dans ce contexte, l'utilisation d'un ou plusieurs antiviraux spécifiques pourrait favoriser la lutte contre ces virus. Il serait donc intéressant de mieux évaluer les effets du peptide z.LVLQTM.fmk sur la réplication *in vivo* de l'EV-71 et du PV-1, en utilisant notamment des modèles murins.

Les protéases virales sont des cibles particulièrement intéressantes pour mettre au point des antiviraux efficaces : elles jouent un rôle essentiel à la réplication du virus cible et elles diffèrent suffisamment de leurs homologues cellulaires de telle sorte que leurs inhibiteurs restent idéalement sans effet sur les protéines cellulaires. En revanche, le problème majeur de ce type de stratégie est que les protéases virales sont particulièrement sensibles à des mutations qui peuvent permettre aux virus d'échapper à l'action de ces inhibiteurs. C'est ainsi que les antiviraux dirigés contre la protéase du VIH se sont révélés extrêmement efficaces mais que la très faible fiabilité de la reverse transcriptase de ce virus fait que de très nombreuses mutations sont introduites à chaque cycle de réplication. La probabilité de mutations conférant une résistance à ces inhibiteurs est donc grande, ce qui explique qu'ils ne soient pas utilisés en monothérapie

et qu'ils soient combinés à des antiviraux ayant d'autres cibles. De plus, des concentrations suboptimales de ces inhibiteurs ne bloquant pas complètement la réplication du virus, créent des conditions favorables à la sélection de mutants résistants. Une bonne observance au traitement est donc un facteur important dans la réussite d'un traitement. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer *in vitro* l'émergence de mutants résistants au peptide z.LVLQTM.fmk et d'analyser les mutations associées à cette résistance. Ces tests permettraient également de mieux comprendre les interactions qui s'établissent entre la protéase 2A et son inhibiteur peptidique. Pour réduire le risque de développement de résistance, il serait également intéressant de tester l'efficacité de la combinaison de plusieurs antiviraux ayant des modes d'action différents (Thibaut, Leyssen et al.).

Si la nature de la protéine virale ciblée peut être remise en cause, l'utilisation de peptides à des fins thérapeutiques peut également être discutée. Des études montrent que plus de 20 % des médicaments appartenant au top 200 des ventes en 2004 étaient à base de protéines ou de peptides (Decaffmeyer 2008). La même année, entre 600 et 700 peptides étaient en stade de développement et plus de 150 étaient à différents stades de phase clinique. Les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules qui constituent les médicaments traditionnels. Le premier avantage est que, représentant souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine, ils offrent une efficacité, une sélectivité et une spécificité que les concepteurs de petites molécules ont du mal à atteindre (Hummel, Reineke et al. 2006). A titre d'exemple, on peut citer les travaux récemment menés sur NAP, un peptide de 8 résidus, le plus petit fragment actif de ADNP (Activity Dependent Neuroprotective Protein) qui montre une activité neuroprotectrice (Gozes and Spivak-Pohis 2006). Ce peptide est actuellement en phase d'essais cliniques. Un deuxième avantage est que les produits de dégradation des peptides sont des acides aminés ce qui élimine grandement les risques de toxicité (Loffet 2002). Enfin, les peptides s'accumulent peu dans les tissus en raison de leur temps de demi-vie court, ce qui peut constituer aussi un désavantage quand il est question de durée d'action. La conception de peptides à usage thérapeutique soulève toutefois un grand nombre de défis : (i) le coût de production est plus élevé que celui des petites molécules et les quantités nécessaires sont plus importantes, (ii) l'administration des peptides thérapeutiques est souvent intraveineuse, ce qui provoque

un manque de confort pour le patient. Toutefois, des stratégies alternatives de délivrance existent, faisant appel notamment à l'administration *via* les muqueuses nasales ou pulmonaires (Prego, Garcia et al. 2005). (iii) Le troisième aspect concerne la biodégradabilité des peptides due aux peptidases du système gastro-intestinal, des reins, du foie et du sérum. Cette dégradation peut être contrée de différentes manières (i) en modifiant les extrémités C et N terminales (par N-acéthylation et N-amidation, par exemple) des peptides pour empêcher l'action des exopeptidases, (ii) en utilisant des acides aminés D ou non-naturels, lesquels sont moins sensibles voir résistants à l'action de ces enzymes, (iii) en cyclisant les peptides par des liaisons Nter-Cter, des ponts disulfures ou la formation d'anneaux lactames (Werle and Bernkop-Schnurch 2006) et (iv) en fixant sur les peptides des unités de poly(éthylène glycol) (Caliceti and Veronese 2003).

Un des défis de cette étude était et reste d'identifier le rôle joué par la protéine RBM6Δ6 dans la cellule. RBM6Δ6 appartient à la famille des protéines RBM qui ont pour caractéristique principale de contenir un ou plusieurs motifs RRM (RNA Recognition Motif). Le rôle de RBM6Δ6 n'est pas connu mais plusieurs membres de la famille RBM semblent être des modulateurs de l'apoptose (Sutherland, Rintala-Maki et al. 2005). Qu'en est-il de RBM6Δ6 ? Nous avons démontré que le peptide LVLQTM qui correspond à l'extrémité C-terminale de RBM6Δ6 est un inhibiteur de la protéase 2A des entérovirus. RBM6Δ6 constitue-t-elle une arme exprimée par les cellules de mammifères pour se défendre contre les infections à entérovirus ? Pour mieux comprendre le rôle joué par cette protéine, nous avons développé plusieurs stratégies afin d'identifier ses partenaires cellulaires. Nous avons ainsi montré que plusieurs partenaires potentiels sont impliqués dans la dégradation des protéines mal repliées. Alors que se passe-t-il au cours d'une infection à entérovirus ? L'hypothèse la plus probable est qu'une fois synthétisée, la protéase 2A piègerait RBMΔ6 et la détournerait de ses fonctions.

Ainsi, nos objectifs à court terme sont : (i) d'accroître l'efficacité et réduire la toxicité du peptide z-LVLQTM-fmk, notamment en remplaçant le groupement fmk par un groupement phenoxy, connu pour avoir une spécificité, une stabilité et une efficacité

accrues ainsi qu'une toxicité réduite par rapport au groupement fmk (Caserta, Smith et al. 2003; Colak, Antar et al. 2009). (ii) d'analyser l'émergence de mutants résistants au peptide LVLQTM *in vitro* sur cellules A549 et *in vivo* chez la souris.

A long terme, nous espérons cristalliser le complexe RVH-2 2A^{pro}/LVLQTM pour mieux comprendre les interactions qui s'établissent entre les deux partenaires et modifier en conséquence le peptide pour le rendre plus affiné pour la protéase virale. Nous envisageons également d'évaluer *in vivo* chez la souris, différentes combinaisons de molécules antivirales pour réduire le risque d'émergence de résistance et augmenter l'efficacité de ces antiviraux.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Almstead, L. L. and P. Sarnow (2007). "Inhibition of U snRNP assembly by a virus-encoded proteinase." Genes Dev **21**(9): 1086-97.
- Amineva, S. P., A. G. Aminev, et al. (2004). "Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells." J Gen Virol **85**(Pt 10): 2969-79.
- Andersen, D. O., N. D. Weber, et al. (1991). "In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives." Antiviral Res **16**(2): 185-96.
- Anderson, E. C., S. L. Hunt, et al. (2007). "Internal initiation of translation from the human rhinovirus-2 internal ribosome entry site requires the binding of Unr to two distinct sites on the 5' untranslated region." J Gen Virol **88**(Pt 11): 3043-52.
- Andino, R., G. E. Rieckhof, et al. (1990). "A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA." Cell **63**(2): 369-80.
- Andrianova, I. V., I. A. Sobenin, et al. (2003). "[Effect of long-acting garlic tablets "allicor" on the incidence of acute respiratory viral infections in children]." Ter Arkh **75**(3): 53-6.
- Andries, K., B. Dewindt, et al. (1992). "In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity." Antimicrob Agents Chemother **36**(1): 100-7.
- Ansardi, D. C., D. C. Porter, et al. (1996). "Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA." Adv Virus Res **46**: 1-68.
- Anzueto, A. and M. S. Niederman (2003). "Diagnosis and treatment of rhinovirus respiratory infections." Chest **123**(5): 1664-72.
- Arruda, E., T. R. Boyle, et al. (1995). "Localization of human rhinovirus replication in the upper respiratory tract by in situ hybridization." J Infect Dis **171**(5): 1329-33.
- Arruda, E., A. Pitkaranta, et al. (1997). "Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn." J Clin Microbiol **35**(11): 2864-8.
- Autret, A., S. Martin-Latil, et al. (2008). "Early phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway activation limits poliovirus-induced JNK-mediated cell death." J Virol **82**(7): 3796-802.

- Autret, A., S. Martin-Latil, et al. (2007). "Poliovirus induces Bax-dependent cell death mediated by c-Jun NH2-terminal kinase." J Virol **81**(14): 7504-16.
- Back, S. H., Y. K. Kim, et al. (2002). "Translation of polioviral mRNA is inhibited by cleavage of polypyrimidine tract-binding proteins executed by polioviral 3C(pro)." J Virol **76**(5): 2529-42.
- Badorff, C., N. Berkely, et al. (2000). "Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue." J Biol Chem **275**(15): 11191-7.
- Badorff, C., B. Fichtlscherer, et al. (2002). "Selective delivery of nitric oxide to a cellular target: a pseudosubstrate-coupled dinitrosyl-iron complex inhibits the enteroviral protease 2A." Nitric Oxide **6**(3): 305-12.
- Badorff, C., G. H. Lee, et al. (1999). "Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy." Nat Med **5**(3): 320-6.
- Bailly, J. L., A. M. Borman, et al. (1996). "Natural isolates of ECHO virus type 25 with extensive variations in IRES sequences and different translational efficiencies." Virology **215**(1): 83-96.
- Barco, A., E. Feduchi, et al. (2000). "A stable HeLa cell line that inducibly expresses poliovirus 2A(pro): effects on cellular and viral gene expression." J Virol **74**(5): 2383-92.
- Barnard, D. L., V. D. Hubbard, et al. (2004). "In vitro activity of expanded-spectrum pyridazinyl oxime ethers related to pirodavir: novel capsid-binding inhibitors with potent antipicornavirus activity." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1766-72.
- Barral, P. M., J. M. Morrison, et al. (2007). "MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells." J Virol **81**(8): 3677-84.
- Barral, P. M., D. Sarkar, et al. (2009). "RIG-I is cleaved during picornavirus infection." Virology **391**(2): 171-6.
- Bartlett, N. W., R. P. Walton, et al. (2008). "Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation." Nat Med **14**(2): 199-204.

- Bazan, J. F. and R. J. Fletterick (1988). "Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 7872-6.
- Bella, J., P. R. Kolatkar, et al. (1999). "The structure of the two amino-terminal domains of human intercellular adhesion molecule-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor." Virus Res **62**(2): 107-17.
- Berendt, A. R., A. McDowall, et al. (1992). "The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site." Cell **68**(1): 71-81.
- Beske, O., M. Reichelt, et al. (2007). "Poliovirus infection blocks ERGIC-to-Golgi trafficking and induces microtubule-dependent disruption of the Golgi complex." J Cell Sci **120**(Pt 18): 3207-18.
- Bienz, K., D. Egger, et al. (1973). "Virus replication, cytopathology, and lysosomal enzyme response of mitotic and interphase Hep-2 cells infected with poliovirus." J Virol **11**(4): 565-74.
- Bieri, S., J. T. Djordjevic, et al. (1995). "Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain." Biochemistry **34**(40): 13059-65.
- Billaud G., L. B. (2004). "Rhinovirus : principal agent des infections des voies aériennes supérieures." Virologie **8**(4): 271-80.
- Binford, S. L., F. Maldonado, et al. (2005). "Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 619-26.
- Blom, N., J. Hansen, et al. (1996). "Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: discovering cellular targets by neural networks." Protein Sci **5**(11): 2203-16.
- Blomqvist, S., C. Savolainen, et al. (2002). "Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features." J Clin Microbiol **40**(11): 4218-23.
- Blumenthal (2005). "Herb sales down 7.4 percent in mainstream market." HerbalGram(66): 63.
- Borman, A. and R. J. Jackson (1992). "Initiation of translation of human rhinovirus RNA: mapping the internal ribosome entry site." Virology **188**(2): 685-96.

- Bostina, M., H. Levy, et al. "Poliovirus RNA is released from the capsid near a twofold symmetry axis." J Virol **85**(2): 776-83.
- Brabec-Zaruba, M., U. Berka, et al. (2007). "Induction of autophagy does not affect human rhinovirus type 2 production." J Virol **81**(19): 10815-7.
- Briese, T., N. Renwick, et al. (2008). "Global distribution of novel rhinovirus genotype." Emerg Infect Dis **14**(6): 944-7.
- Brown, B. A. and E. Ehrenfeld (1979). "Translation of poliovirus RNA in vitro: changes in cleavage pattern and initiation sites by ribosomal salt wash." Virology **97**(2): 396-405.
- Brown, R. N., R. Cameron, et al. (2005). "2-Ethoxybenzoxazole as a bioisosteric replacement of an ethyl benzoate group in a human rhinovirus (HRV) capsid binder." Bioorg Med Chem Lett **15**(8): 2051-5.
- Butterworth, B. E. and B. D. Korant (1974). "Characterization of the large picornaviral polypeptides produced in the presence of zinc ion." J Virol **14**(2): 282-91.
- Calandria, C., A. Irurzun, et al. (2004). "Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells." Virus Res **104**(1): 39-49.
- Caliceti, P. and F. M. Veronese (2003). "Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates." Adv Drug Deliv Rev **55**(10): 1261-77.
- Caliguiri, L. A., J. J. McSharry, et al. (1980). "Effect of arildone on modifications of poliovirus in vitro." Virology **105**(1): 86-93.
- Cameron, C. E., H. S. Oh, et al. "Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle." Future Microbiol **5**(6): 867-81.
- Carlucci, M. J., L. A. Scolaro, et al. (2004). "Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice." Antiviral Res **64**(2): 137-41.
- carrasco, L., guinea, R., Irurzun, A., &Barco, A. (2002). effects of viral replication on cellular membrane metabolism and function. Poliovirus receptors and cell entry. B. L. S. E. Wimmer. washington D.C., ASM Press: 337-354.
- Caserta, T. M., A. N. Smith, et al. (2003). "Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties." Apoptosis **8**(4): 345-52.

- Castello, A., E. Alvarez, et al. "The multifaceted poliovirus 2A protease: regulation of gene expression by picornavirus proteases." J Biomed Biotechnol **2011**: 369648.
- Castello, A., J. M. Izquierdo, et al. (2009). "RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage." J Cell Sci **122**(Pt 20): 3799-809.
- Cate, T. R., R. B. Couch, et al. (1965). "Production of Tracheobronchitis in Volunteers with Rhinovirus in a Small-Particle Aerosol." Am J Epidemiol **81**: 95-105.
- Chantzi, F. M., N. G. Papadopoulos, et al. (2006). "Human rhinoviruses in otitis media with effusion." Pediatr Allergy Immunol **17**(7): 514-8.
- Chau, D. H., J. Yuan, et al. (2007). "Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1." Apoptosis **12**(3): 513-24.
- Chen, S. H., J. Lamar, et al. (2003). "Synthesis and evaluation of tripeptidyl alpha-ketoamides as human rhinovirus 3C protease inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **13**(20): 3531-6.
- Chow, M., J. F. Newman, et al. (1987). "Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance." Nature **327**(6122): 482-6.
- Chuchalin, A. G., B. Berman, et al. (2005). "Treatment of acute bronchitis in adults with a pelargonium sidoides preparation (EPs 7630): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Explore (NY) **1**(6): 437-45.
- Colak, A., V. Antar, et al. (2009). "Q-VD-OPh, a pancaspase inhibitor, reduces trauma-induced apoptosis and improves the recovery of hind-limb function in rats after spinal cord injury." Neurocirugia (Astur) **20**(6): 533-40; discussion 540.
- Collis, P. S., B. J. O'Donnell, et al. (1992). "Replication of poliovirus RNA and subgenomic RNA transcripts in transfected cells." J Virol **66**(11): 6480-8.
- Colonno, R. J., P. L. Callahan, et al. (1986). "Isolation of a monoclonal antibody that blocks attachment of the major group of human rhinoviruses." J Virol **57**(1): 7-12.
- Colonno, R. J., J. H. Condra, et al. (1988). "Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5449-53.

- Cordey, S. (2008). "Rhinovirus : diversité clinique et génomique." Virologie **12**((5)): 361-73.
- Cordey, S., D. Gerlach, et al. (2008). "The cis-acting replication elements define human enterovirus and rhinovirus species." RNA **14**(8): 1568-78.
- Cordey, S., T. Junier, et al. "Rhinovirus genome evolution during experimental human infection." PLoS One **5**(5): e10588.
- Cordingley, M. G., P. L. Callahan, et al. (1990). "Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage in vitro." J Biol Chem **265**(16): 9062-5.
- Craig, A., D. Fernandez-Reyes, et al. (2000). "A functional analysis of a natural variant of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1Kilifi)." Hum Mol Genet **9**(4): 525-30.
- Craighead, J. E., M. Meier, et al. (1969). "Pulmonary infection due to rhinovirus type 13." N Engl J Med **281**(25): 1403-4.
- Crump, C. E., E. Arruda, et al. (1994). "Comparative antirhinoviral activities of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and chimeric ICAM-1/immunoglobulin A molecule." Antimicrob Agents Chemother **38**(6): 1425-7.
- De Clercq, E., J. Murase, et al. (1991). "Broad-spectrum antiviral and cytotoxic activity of cyclopentenylcytosine, a carbocyclic nucleoside targeted at CTP synthetase." Biochem Pharmacol **41**(12): 1821-9.
- de Jong, A. S., F. de Mattia, et al. (2008). "Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking." J Virol **82**(7): 3782-90.
- De Palma, A. M., I. Vliegen, et al. (2008). "Selective inhibitors of picornavirus replication." Med Res Rev **28**(6): 823-84.
- Decaffmeyer (2008). "Les médicaments peptidiques : mythe ou réalité ?" Biotechnol.Agron.Soc.Environ **12**((1)): 81_88.
- Deitz, S. B., D. A. Dodd, et al. (2000). "MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13790-5.
- den Boon, J. A., A. Diaz, et al. "Cytoplasmic viral replication complexes." Cell Host Microbe **8**(1): 77-85.

- Deszcz, L., R. Cencic, et al. (2006). "An antiviral peptide inhibitor that is active against picornavirus 2A proteinases but not cellular caspases." J Virol **80**(19): 9619-27.
- Deszcz, L., E. Gaudernak, et al. (2005). "Apoptotic events induced by human rhinovirus infection." J Gen Virol **86**(Pt 5): 1379-89.
- Deszcz, L., J. Seipelt, et al. (2004). "Antiviral activity of caspase inhibitors: effect on picornaviral 2A proteinase." FEBS Lett **560**(1-3): 51-5.
- Diana, G. D., M. A. McKinlay, et al. (1985). "Isoxazoles with antipicornavirus activity." J Med Chem **28**(6): 748-52.
- Diana, G. D., M. J. Otto, et al. (1985). "Inhibitors of picornavirus uncoating as antiviral agents." Pharmacol Ther **29**(3): 287-97.
- Diana, G. D., P. Rudewicz, et al. (1995). "Picornavirus inhibitors: trifluoromethyl substitution provides a global protective effect against hepatic metabolism." J Med Chem **38**(8): 1355-71.
- Diana, G. D., U. J. Salvador, et al. (1977). "Antiviral activity of some beta-diketones. 2. Aryloxy alkyl diketones. In vitro activity against both RNA and DNA viruses." J Med Chem **20**(6): 757-61.
- Diana, G. D., U. J. Salvador, et al. (1977). "Antiviral activity of some beta-diketones. 1. Aryl alkyl diketones. In vitro activity against both RNA and DNA viruses." J Med Chem **20**(6): 750-6.
- Dodd, D. A., T. H. Giddings, Jr., et al. (2001). "Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection." J Virol **75**(17): 8158-65.
- Doedens, J. R., T. H. Giddings, Jr., et al. (1997). "Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis." J Virol **71**(12): 9054-64.
- Doedens, J. R. and K. Kirkegaard (1995). "Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A." Embo J **14**(5): 894-907.
- Dorner, A. J., B. L. Semler, et al. (1984). "In vitro translation of poliovirus RNA: utilization of internal initiation sites in reticulocyte lysate." J Virol **50**(2): 507-14.
- Douglas, R. G., Jr., T. R. Cate, et al. (1966). "Quantitative rhinovirus shedding patterns in volunteers." Am Rev Respir Dis **94**(2): 159-67.

- Dragovich, P. S., T. J. Prins, et al. (2003). "Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of irreversible human rhinovirus 3C protease inhibitors. 8. Pharmacological optimization of orally bioavailable 2-pyridone-containing peptidomimetics." J Med Chem **46**(21): 4572-85.
- Dragovich, P. S., R. Zhou, et al. (2000). "Structure-based design of ketone-containing, tripeptidyl human rhinovirus 3C protease inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **10**(1): 45-8.
- Drake, J. W. (1999). "The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes." Ann N Y Acad Sci **870**: 100-7.
- Dreschers, S., P. Franz, et al. (2007). "Infections with human rhinovirus induce the formation of distinct functional membrane domains." Cell Physiol Biochem **20**(1-4): 241-54.
- Duechler, M., S. Ketter, et al. (1993). "Rhinoviral receptor discrimination: mutational changes in the canyon regions of human rhinovirus types 2 and 14 indicate a different site of interaction." J Gen Virol **74** (Pt 10): 2287-91.
- Dunnebacke, T. H., J. D. Levinthal, et al. (1969). "Entry and release of poliovirus as observed by electron microscopy of cultured cells." J Virol **4**(4): 505-13.
- Echeverri, A. C. and A. Dasgupta (1995). "Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding." Virology **208**(2): 540-53.
- Egger, D. and K. Bienz (2002). "Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites." J Virol **76**(21): 10960-71.
- Etchison, D. and S. Fout (1985). "Human rhinovirus 14 infection of HeLa cells results in the proteolytic cleavage of the p220 cap-binding complex subunit and inactivates globin mRNA translation in vitro." J Virol **54**(2): 634-8.
- Fabian, P., J. Brain, et al. (2011). "Origin of exhaled breath particles from healthy and human rhinovirus-infected subjects." J Aerosol Med Pulm Drug Deliv **24**(3): 137-47.
- Falah, N., S. Violot, et al. (2011). "Ex Vivo and In Vivo Inhibition of Human Rhinovirus Replication by a New Pseudosubstrate of Viral 2A Protease." J Virol.

- Fang, F. and M. Yu (2004). "Viral receptor blockage by multivalent recombinant antibody fusion proteins: inhibiting human rhinovirus (HRV) infection with CFY196." J Antimicrob Chemother **53**(1): 23-5.
- Farr, B. M., J. M. Gwaltney, Jr., et al. (1990). "A randomized controlled trial of glucocorticoid prophylaxis against experimental rhinovirus infection." J Infect Dis **162**(5): 1173-7.
- Fass, D., S. Blacklow, et al. (1997). "Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module." Nature **388**(6643): 691-3.
- Fendrick, A. M., A. S. Monto, et al. (2003). "The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States." Arch Intern Med **163**(4): 487-94.
- Fernandez-Miragall, O., S. Lopez de Quinto, et al. (2009). "Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements." Virus Res **139**(2): 172-82.
- Fernandez-Reyes, D., A. G. Craig, et al. (1997). "A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya." Hum Mol Genet **6**(8): 1357-60.
- Formstecher, E., S. Aresta, et al. (2005). "Protein interaction mapping: a Drosophila case study." Genome Res **15**(3): 376-84.
- Fricks, C. E. and J. M. Hogle (1990). "Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding." J Virol **64**(5): 1934-45.
- Fromont-Racine, M., J. C. Rain, et al. (1997). "Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens." Nat Genet **16**(3): 277-82.
- Fuchs, R. and D. Blaas "Uncoating of human rhinoviruses." Rev Med Virol **20**(5): 281-97.
- Garbino, J., M. W. Gerbase, et al. (2004). "Lower respiratory viral illnesses: improved diagnosis by molecular methods and clinical impact." Am J Respir Crit Care Med **170**(11): 1197-203.
- Garriga, D., A. Pickl-Herk, et al. (2012). "Insights into minor group rhinovirus uncoating: the X-ray structure of the HRV2 empty capsid." PLoS Pathog **8**(1): e1002473.

- Geller, R., M. Vignuzzi, et al. (2007). "Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance." Genes Dev **21**(2): 195-205.
- Gern, J. E. (2010). "The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma." J Virol **84**(15): 7418-26.
- Gern, J. E. and W. W. Busse (1999). "Association of rhinovirus infections with asthma." Clin Microbiol Rev **12**(1): 9-18.
- Gern, J. E., E. C. Dick, et al. (1997). "Rhinovirus-specific T cells recognize both shared and serotype-restricted viral epitopes." J Infect Dis **175**(5): 1108-14.
- Ghildyal, R., B. Jordan, et al. (2009). "Rhinovirus 3C protease can localize in the nucleus and alter active and passive nucleocytoplasmic transport." J Virol **83**(14): 7349-52.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." Annu Rev Biochem **68**: 913-63.
- Goldstaub, D., A. Gradi, et al. (2000). "Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death." Mol Cell Biol **20**(4): 1271-7.
- Gonzalez, M. E., B. Alarcon, et al. (1987). "Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan." Antimicrob Agents Chemother **31**(9): 1388-93.
- Gorbalenya, A. E., A. P. Donchenko, et al. (1989). "Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold." FEBS Lett **243**(2): 103-14.
- Gozes, I. and I. Spivak-Pohis (2006). "Neurotrophic effects of the peptide NAP: a novel neuroprotective drug candidate." Curr Alzheimer Res **3**(3): 197-9.
- Graham, K. L., K. E. Gustin, et al. (2004). "Proteolytic cleavage of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase during poliovirus infection." J Virol **78**(12): 6313-21.
- Grassauer, A., R. Weinmuellner, et al. (2008). "Iota-Carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection." Virol J **5**: 107.
- Greninger, A. L., C. Runckel, et al. (2009). "The complete genome of klassevirus - a novel picornavirus in pediatric stool." Virol J **6**: 82.

- Guinea, R., A. Lopez-Rivas, et al. (1989). "Modification of phospholipase C and phospholipase A2 activities during poliovirus infection." J Biol Chem **264**(36): 21923-7.
- Guittet, V., J. Brouard, et al. (2003). "[Rhinovirus and acute respiratory infections in hospitalized children. Retrospective study 1998-2000]." Arch Pediatr **10**(5): 417-23.
- Gustin, K. E. and P. Sarnow (2001). "Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition." Embo J **20**(1-2): 240-9.
- Gustin, K. E. and P. Sarnow (2002). "Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus." J Virol **76**(17): 8787-96.
- Gwaltney, J. M. (2002). "Clinical significance and pathogenesis of viral respiratory infections." Am J Med **112 Suppl 6A**: 13S-18S.
- Gwaltney, J. M. and J. O. Hendley (1978). "Rhinovirus transmission: one if by air, two if by hand." Trans Am Clin Climatol Assoc **89**: 194-200.
- Gwaltney, J. M., Jr., P. B. Moskalski, et al. (1978). "Hand-to-hand transmission of rhinovirus colds." Ann Intern Med **88**(4): 463-7.
- Gwaltney, J. M., Jr., C. D. Phillips, et al. (1994). "Computed tomographic study of the common cold." N Engl J Med **330**(1): 25-30.
- Hadfield, A. T., W. Lee, et al. (1997). "The refined structure of human rhinovirus 16 at 2.15 Å resolution: implications for the viral life cycle." Structure **5**(3): 427-41.
- Hambidge, S. J. and P. Sarnow (1992). "Translational enhancement of the poliovirus 5' noncoding region mediated by virus-encoded polypeptide 2A." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10272-6.
- Hamdouchi, C., J. de Blas, et al. (1999). "2-Amino-3-substituted-6-[(E)-1-phenyl-2-(N-methylcarbamoyl)vinyl]imidazo[1,2-a]pyridines as a novel class of inhibitors of human rhinovirus: stereospecific synthesis and antiviral activity." J Med Chem **42**(1): 50-9.
- Hamdouchi, C., J. Ezquerro, et al. (1999). "Short synthesis and anti-rhinoviral activity of imidazo[1,2-a]pyridines: the effect of acyl groups at 3-position." Bioorg Med Chem Lett **9**(10): 1391-4.

- Harisch, G. and M. Kretschmer (1987). "Some aspects of a non-linear effect of zinc ions on the histamine release from rat peritoneal mast cells." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **55**(1): 39-48.
- Harris, J. M., 2nd and J. M. Gwaltney, Jr. (1996). "Incubation periods of experimental rhinovirus infection and illness." Clin Infect Dis **23**(6): 1287-90.
- Harvala, H. and P. Simmonds (2009). "Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance." J Clin Virol **45**(1): 1-9.
- Hayden, F. G., J. K. Albrecht, et al. (1986). "Prevention of natural colds by contact prophylaxis with intranasal alpha 2-interferon." N Engl J Med **314**(2): 71-5.
- Hayden, F. G., K. Andries, et al. (1992). "Safety and efficacy of intranasal pirodavir (R77975) in experimental rhinovirus infection." Antimicrob Agents Chemother **36**(4): 727-32.
- Hayden, F. G., T. Coats, et al. (2002). "Oral pleconaril treatment of picornavirus-associated viral respiratory illness in adults: efficacy and tolerability in phase II clinical trials." Antivir Ther **7**(1): 53-65.
- Hayden, F. G. and J. M. Gwaltney, Jr. (1982). "Prophylactic activity of intranasal enviroxime against experimentally induced rhinovirus type 39 infection." Antimicrob Agents Chemother **21**(6): 892-7.
- Hayden, F. G. and J. M. Gwaltney, Jr. (1983). "Intranasal interferon alpha 2 for prevention of rhinovirus infection and illness." J Infect Dis **148**(3): 543-50.
- Hayden, F. G. and J. M. Gwaltney, Jr. (1984). "Intranasal interferon-alpha 2 treatment of experimental rhinoviral colds." J Infect Dis **150**(2): 174-80.
- Hayden, F. G., J. M. Gwaltney, Jr., et al. (1988). "Modification of experimental rhinovirus colds by receptor blockade." Antiviral Res **9**(4): 233-47.
- Hayden, F. G., D. T. Herrington, et al. (2003). "Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials." Clin Infect Dis **36**(12): 1523-32.
- Hayden, F. G., R. B. Turner, et al. (2003). "Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled studies of rupintrivir nasal spray 2-percent suspension for prevention and treatment of experimentally induced rhinovirus colds in healthy volunteers." Antimicrob Agents Chemother **47**(12): 3907-16.

- Hayden, G. F., D. Deforest, et al. (1984). "Inactivation of rhinovirus on human fingers by virucidal activity of glutaric acid." Antimicrob Agents Chemother **26**(6): 928-9.
- Heikkinen, T. and A. Jarvinen (2003). "The common cold." Lancet **361**(9351): 51-9.
- Heinz, B. A. and L. M. Vance (1995). "The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus." J Virol **69**(7): 4189-97.
- Heinz, B. A. and L. M. Vance (1996). "Sequence determinants of 3A-mediated resistance to enviroxime in rhinoviruses and enteroviruses." J Virol **70**(7): 4854-7.
- hellen C. & Wimmer, E. (1995). enterovirus structure and assembly. human enterovirus infectiob. H. A. Rotbart. Washington DC, ASM: 155-174.
- Hendley, J. O. and J. M. Gwaltney, Jr. (1988). "Mechanisms of transmission of rhinovirus infections." Epidemiol Rev **10**: 243-58.
- Herz, J. (2001). "Deconstructing the LDL receptor--a rhapsody in pieces." Nat Struct Biol **8**(6): 476-8.
- Hewat, E. A., E. Neumann, et al. (2000). "The cellular receptor to human rhinovirus 2 binds around the 5-fold axis and not in the canyon: a structural view." Embo J **19**(23): 6317-25.
- Hodits, R. A., J. Nimpf, et al. (1995). "An antibody fragment from a phage display library competes for ligand binding to the low density lipoprotein receptor family and inhibits rhinovirus infection." J Biol Chem **270**(41): 24078-85.
- Hofer, F., M. Gruenberger, et al. (1994). "Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1839-42.
- Holtz, L. R., S. R. Finkbeiner, et al. (2008). "Identification of a novel picornavirus related to cosaviruses in a child with acute diarrhea." Virol J **5**: 159.
- Holtz, L. R., S. R. Finkbeiner, et al. (2009). "Klassevirus 1, a previously undescribed member of the family Picornaviridae, is globally widespread." Virol J **6**: 86.
- Huang, H., A. Alexandrov, et al. (2001). "Structure of an RNA hairpin from HRV-14." Biochemistry **40**(27): 8055-64.

- Huguenel, E. D., D. Cohn, et al. (1997). "Prevention of rhinovirus infection in chimpanzees by soluble intercellular adhesion molecule-1." Am J Respir Crit Care Med **155**(4): 1206-10.
- Hummel, G., U. Reineke, et al. (2006). "Translating peptides into small molecules." Mol Biosyst **2**(10): 499-508.
- Igarashi, H., Y. Yoshino, et al. "2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication." J Virol **84**(12): 5947-57.
- Iurzun, A., J. Arroyo, et al. (1995). "Enhanced intracellular calcium concentration during poliovirus infection." J Virol **69**(8): 5142-6.
- Ishizuka, S., M. Yamaya, et al. (2003). "Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells." J Infect Dis **188**(12): 1928-39.
- Jackson, D. J., R. E. Gangnon, et al. (2008). "Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children." Am J Respir Crit Care Med **178**(7): 667-72.
- Jackson, W. T., T. H. Giddings, Jr., et al. (2005). "Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses." PLoS Biol **3**(5): e156.
- Joachims, M., P. C. Van Breugel, et al. (1999). "Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro." J Virol **73**(1): 718-27.
- Johnson, K. L. and P. Sarnow (1991). "Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus." J Virol **65**(8): 4341-9.
- Johnston, S. L., P. K. Pattemore, et al. (1995). "Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children." BMJ **310**(6989): 1225-9.
- Josling, P. (2001). "Preventing the common cold with a garlic supplement: a double-blind, placebo-controlled survey." Adv Ther **18**(4): 189-93.
- Jurgens, C. K., D. J. Barton, et al. (2006). "2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA." Virology **345**(2): 346-57.

- Kadam, S., J. Poddig, et al. (1994). "Citrinin hydrate and radicinin: human rhinovirus 3C-protease inhibitors discovered in a target-directed microbial screen." J Antibiot (Tokyo) **47**(7): 836-9.
- Kairis, B., P. Sauter, et al. (2009). "[When an enterovirus emerges]." Pathol Biol (Paris) **57**(3): 258-67.
- Kaiser, L., J. D. Aubert, et al. (2006). "Chronic rhinoviral infection in lung transplant recipients." Am J Respir Crit Care Med **174**(12): 1392-9.
- Kaiser, L., C. E. Crump, et al. (2000). "In vitro activity of pleconaril and AG7088 against selected serotypes and clinical isolates of human rhinoviruses." Antiviral Res **47**(3): 215-20.
- Kapoor, A., J. Victoria, et al. (2008). "A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20482-7.
- Karttunen, A., T. Poyry, et al. (2003). "Variation in enterovirus receptor genes." J Med Virol **70**(1): 99-108.
- Kerekatte, V., B. D. Keiper, et al. (1999). "Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff?" J Virol **73**(1): 709-17.
- Kim, S. S., T. J. Smith, et al. (1989). "Crystal structure of human rhinovirus serotype 1A (HRV1A)." J Mol Biol **210**(1): 91-111.
- Kistler, A. L., D. R. Webster, et al. (2007). "Genome-wide diversity and selective pressure in the human rhinovirus." Virol J **4**: 40.
- Klein, K. A. and W. T. Jackson "Human rhinovirus 2 induces the autophagic pathway and replicates more efficiently in autophagic cells." J Virol **85**(18): 9651-4.
- Kolatkhar, P. R., J. Bella, et al. (1999). "Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor." Embo J **18**(22): 6249-59.
- Kondratova, A. A., N. Neznanov, et al. (2005). "Poliovirus protein 3A binds and inactivates LIS1, causing block of membrane protein trafficking and deregulation of cell division." Cell Cycle **4**(10): 1403-10.
- Konig, H. and B. Rosenwirth (1988). "Purification and partial characterization of poliovirus protease 2A by means of a functional assay." J Virol **62**(4): 1243-50.

- Korant, B. D. and B. E. Butterworth (1976). "Inhibition by zinc of rhinovirus protein cleavage: interaction of zinc with capsid polypeptides." J Virol **18**(1): 298-306.
- Kuo, R. L., S. H. Kung, et al. (2002). "Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death." J Gen Virol **83**(Pt 6): 1367-76.
- Kusel, M. M., N. H. de Klerk, et al. (2007). "Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma." J Allergy Clin Immunol **119**(5): 1105-10.
- Laine, P., S. Blomqvist, et al. (2006). "Alignment of capsid protein VP1 sequences of all human rhinovirus prototype strains: conserved motifs and functional domains." J Gen Virol **87**(Pt 1): 129-38.
- Lall, M. S., Y. K. Ramtohul, et al. (2002). "Serine and threonine beta-lactones: a new class of hepatitis A virus 3C cysteine proteinase inhibitors." J Org Chem **67**(5): 1536-47.
- Lamphear, B. J., R. Kirchweger, et al. (1995). "Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation." J Biol Chem **270**(37): 21975-83.
- Lamphear, B. J., R. Yan, et al. (1993). "Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus." J Biol Chem **268**(26): 19200-3.
- Lau, C., X. Wang, et al. (2008). "Syk associates with clathrin and mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation during human rhinovirus internalization." J Immunol **180**(2): 870-80.
- Lau, S. K., C. C. Yip, et al. (2007). "Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children." J Clin Microbiol **45**(11): 3655-64.
- Ledford, R. M., N. R. Patel, et al. (2004). "VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds." J Virol **78**(7): 3663-74.
- Lenk, R. and S. Penman (1979). "The cytoskeletal framework and poliovirus metabolism." Cell **16**(2): 289-301.

- Levandowski, R. A., C. T. Pachucki, et al. (1982). "Topical enviroxime against rhinovirus infection." Antimicrob Agents Chemother **22**(6): 1004-7.
- Li, L., J. Victoria, et al. (2009). "A novel picornavirus associated with gastroenteritis." J Virol **83**(22): 12002-6.
- Li, M. L., T. A. Hsu, et al. (2002). "The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis." Virology **293**(2): 386-95.
- Li, X., H. H. Lu, et al. (2001). "The C-terminal residues of poliovirus proteinase 2A(pro) are critical for viral RNA replication but not for cis- or trans-proteolytic cleavage." J Gen Virol **82**(Pt 2): 397-408.
- Linde, K., B. Barrett, et al. (2006). "Echinacea for preventing and treating the common cold." Cochrane Database Syst Rev(1): CD000530.
- Lineberger, D. W., D. J. Graham, et al. (1990). "Antibodies that block rhinovirus attachment map to domain 1 of the major group receptor." J Virol **64**(6): 2582-7.
- Lissiman, E., A. L. Bhasale, et al. (2009). "Garlic for the common cold." Cochrane Database Syst Rev(3): CD006206.
- Liu, C. C., H. W. Tseng, et al. (2000). "An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations." J Clin Virol **17**(1): 23-30.
- Loffet, A. (2002). "Peptides as drugs: is there a market?" J Pept Sci **8**(1): 1-7.
- Lonberg-Holm, K. and B. D. Korant (1972). "Early interaction of rhinoviruses with host cells." J Virol **9**(1): 29-40.
- Makela, M. J., T. Puhakka, et al. (1998). "Viruses and bacteria in the etiology of the common cold." J Clin Microbiol **36**(2): 539-42.
- Malcolm, B. A., C. Lowe, et al. (1995). "Peptide aldehyde inhibitors of hepatitis A virus 3C proteinase." Biochemistry **34**(25): 8172-9.
- Malmstrom, K., A. Pitkaranta, et al. (2006). "Human rhinovirus in bronchial epithelium of infants with recurrent respiratory symptoms." J Allergy Clin Immunol **118**(3): 591-6.
- Marlin, S. D., D. E. Staunton, et al. (1990). "A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection." Nature **344**(6261): 70-2.

- Marlovits, T. C., C. Abrahamsberg, et al. (1998). "Soluble LDL minireceptors. Minimal structure requirements for recognition of minor group human rhinovirus." J Biol Chem **273**(50): 33835-40.
- Marlovits, T. C., T. Zechmeister, et al. (1998). "Recombinant soluble low-density lipoprotein receptor fragment inhibits common cold infection." J Mol Recognit **11**(1-6): 49-51.
- Matthews, D. A., P. S. Dragovich, et al. (1999). "Structure-assisted design of mechanism-based irreversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease with potent antiviral activity against multiple rhinovirus serotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11000-7.
- Matthews, D. A., W. W. Smith, et al. (1994). "Structure of human rhinovirus 3C protease reveals a trypsin-like polypeptide fold, RNA-binding site, and means for cleaving precursor polyprotein." Cell **77**(5): 761-71.
- Matthys, H., R. Eisebitt, et al. (2003). "Efficacy and safety of an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in adults with acute bronchitis. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Phytomedicine **10 Suppl 4**: 7-17.
- Matthys, H. and M. Heger (2007). "EPs 7630-solution--an effective therapeutic option in acute and exacerbating bronchitis." Phytomedicine **14 Suppl 6**: 65-8.
- Matthys, H. and M. Heger (2007). "Treatment of acute bronchitis with a liquid herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides* (EPs 7630): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study." Curr Med Res Opin **23**(2): 323-31.
- Matthys, H., W. Kamin, et al. (2007). "Pelargonium sidoides preparation (EPs 7630) in the treatment of acute bronchitis in adults and children." Phytomedicine **14 Suppl 6**: 69-73.
- McBride, A. E., A. Schlegel, et al. (1996). "Human protein Sam68 relocalization and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2296-301.
- McClelland, A., J. deBear, et al. (1991). "Identification of monoclonal antibody epitopes and critical residues for rhinovirus binding in domain 1 of intercellular adhesion molecule 1." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(18): 7993-7.

- McErlean, P., L. A. Shackelton, et al. (2007). "Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis." J Clin Virol **39**(2): 67-75.
- McKinlay, M. A. (1985). "WIN 51711, a new systematically active broad-spectrum antipicornavirus agent." J Antimicrob Chemother **16**(3): 284-6.
- McKinlay, M. A., J. V. Miralles, et al. (1982). "Prevention of human poliovirus-induced paralysis and death in mice by the novel antiviral agent arildone." Antimicrob Agents Chemother **22**(6): 1022-5.
- McKnight, K. L. and S. M. Lemon (1996). "Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA." J Virol **70**(3): 1941-52.
- McKnight, K. L. and S. M. Lemon (1998). "The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication." RNA **4**(12): 1569-84.
- McSharry, J. J., L. A. Caliguiri, et al. (1979). "Inhibition of uncoating of poliovirus by arildone, a new antiviral drug." Virology **97**(2): 307-15.
- Meerovitch, K., Y. V. Svitkin, et al. (1993). "La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate." J Virol **67**(7): 3798-807.
- Mellits, K. H., J. M. Meredith, et al. (1998). "Binding of a cellular factor to the 3' untranslated region of the RNA genomes of entero- and rhinoviruses plays a role in virus replication." J Gen Virol **79** (Pt 7): 1715-23.
- Miller, E. K., K. M. Edwards, et al. (2009). "A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations." J Allergy Clin Immunol **123**(1): 98-104 e1.
- Miller, F. D., A. S. Monto, et al. (1985). "Controlled trial of enviroxime against natural rhinovirus infections in a community." Antimicrob Agents Chemother **27**(1): 102-6.
- Miller, S. and J. Krijnse-Locker (2008). "Modification of intracellular membrane structures for virus replication." Nat Rev Microbiol **6**(5): 363-74.
- Molla, A., C. U. Hellen, et al. (1993). "Inhibition of proteolytic activity of poliovirus and rhinovirus 2A proteinases by elastase-specific inhibitors." J Virol **67**(8): 4688-95.

- Monto, A. S. (2002). "The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition." Clin Ther **24**(12): 1987-97.
- Monto, A. S., S. A. Schwartz, et al. (1989). "Ineffectiveness of postexposure prophylaxis of rhinovirus infection with low-dose intranasal alpha 2b interferon in families." Antimicrob Agents Chemother **33**(3): 387-90.
- Monto, A. S. and B. M. Ullman (1974). "Acute respiratory illness in an American community. The Tecumseh study." JAMA **227**(2): 164-9.
- Morrison, J. M. and V. R. Racaniello (2009). "Proteinase 2Apro is essential for enterovirus replication in type I interferon-treated cells." J Virol **83**(9): 4412-22.
- Moser, R., L. Snyers, et al. (2005). "Neutralization of a common cold virus by concatemers of the third ligand binding module of the VLDL-receptor strongly depends on the number of modules." Virology **338**(2): 259-69.
- Mosimann, S. C., M. M. Cherney, et al. (1997). "Refined X-ray crystallographic structure of the poliovirus 3C gene product." J Mol Biol **273**(5): 1032-47.
- Mosser, A. G., R. Brockman-Schneider, et al. (2002). "Similar frequency of rhinovirus-infectible cells in upper and lower airway epithelium." J Infect Dis **185**(6): 734-43.
- Murray, M. A., J. W. Janc, et al. (2001). "Peptidyl diazomethyl ketones inhibit the human rhinovirus 3C protease: effect on virus yield by partial block of P3 polyprotein processing." Antivir Chem Chemother **12**(5): 273-81.
- Naclerio, R. M., D. Proud, et al. (1988). "Is histamine responsible for the symptoms of rhinovirus colds? A look at the inflammatory mediators following infection." Pediatr Infect Dis J **7**(3): 218-22.
- Neubauer, C., L. Frasel, et al. (1987). "Mechanism of entry of human rhinovirus 2 into HeLa cells." Virology **158**(1): 255-8.
- Neumann, E., R. Moser, et al. (2003). "A cellular receptor of human rhinovirus type 2, the very-low-density lipoprotein receptor, binds to two neighboring proteins of the viral capsid." J Virol **77**(15): 8504-11.
- Newcomb, D. C., U. S. Sajjan, et al. (2008). "Human rhinovirus 1B exposure induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent airway inflammation in mice." Am J Respir Crit Care Med **177**(10): 1111-21.

- Nicholson, K. G., J. Kent, et al. (1993). "Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults." BMJ **307**(6910): 982-6.
- Nicodemou, A., M. Petsch, et al. (2005). "Rhinovirus-stabilizing activity of artificial VLDL-receptor variants defines a new mechanism for virus neutralization by soluble receptors." FEBS Lett **579**(25): 5507-11.
- Novick, S. G., J. C. Godfrey, et al. (1996). "How does zinc modify the common cold? Clinical observations and implications regarding mechanisms of action." Med Hypotheses **46**(3): 295-302.
- Nugent, C. I., K. L. Johnson, et al. (1999). "Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA." J Virol **73**(1): 427-35.
- Nurani, G., B. Lindqvist, et al. (2003). "Receptor priming of major group human rhinoviruses for uncoating and entry at mild low-pH environments." J Virol **77**(22): 11985-91.
- Ockenhouse, C. F., R. Betageri, et al. (1992). "Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus." Cell **68**(1): 63-9.
- Ohlin, A., H. Hoover-Litty, et al. (1994). "Spectrum of activity of soluble intercellular adhesion molecule-1 against rhinovirus reference strains and field isolates." Antimicrob Agents Chemother **38**(6): 1413-5.
- Ohlmann, T., M. Rau, et al. (1996). "The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E." Embo J **15**(6): 1371-82.
- Oliveira, M. A., R. Zhao, et al. (1993). "The structure of human rhinovirus 16." Structure **1**(1): 51-68.
- Oliver, B. G., S. Lim, et al. (2008). "Rhinovirus exposure impairs immune responses to bacterial products in human alveolar macrophages." Thorax **63**(6): 519-25.
- Olson, N. H., P. R. Kolatkar, et al. (1993). "Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 507-11.
- Otto, M. J., M. P. Fox, et al. (1985). "In vitro activity of WIN 51711, a new broad-spectrum antipicornavirus drug." Antimicrob Agents Chemother **27**(6): 883-6.

- Pallansch, M. A. (2007). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. Fields Virology. Knipe. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.
- Palmenberg, A. C. (1982). "In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures." J Virol **44**(3): 900-6.
- Palmenberg, A. C., J. A. Rathe, et al. (2010). "Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus." J Allergy Clin Immunol **125**(6): 1190-9; quiz 1200-1.
- Palmenberg, A. C., D. Spiro, et al. (2009). "Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution." Science **324**(5923): 55-9.
- Papadopoulos, N. G., P. J. Bates, et al. (2000). "Rhinoviruses infect the lower airways." J Infect Dis **181**(6): 1875-84.
- Papadopoulos, N. G. and S. L. Johnston (2000). "Rhinoviruses as pathogens of the lower respiratory tract." Can Respir J **7**(5): 409-14.
- Papadopoulos, N. G., G. Sanderson, et al. (1999). "Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures." J Med Virol **58**(1): 100-4.
- Papi, A., L. A. Stanciu, et al. (2000). "Rhinovirus infection induces major histocompatibility complex class I and costimulatory molecule upregulation on respiratory epithelial cells." J Infect Dis **181**(5): 1780-4.
- Park, N., P. Katikaneni, et al. (2008). "Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirus-infected cells." J Virol **82**(4): 1647-55.
- Park, N., T. Skern, et al. "Specific cleavage of the nuclear pore complex protein Nup62 by a viral protease." J Biol Chem **285**(37): 28796-805.
- Passariello, C., S. Schippa, et al. (2006). "Rhinoviruses promote internalisation of Staphylococcus aureus into non-fully permissive cultured pneumocytes." Microbes Infect **8**(3): 758-66.
- Patick, A. K. (2006). "Rhinovirus chemotherapy." Antiviral Res **71**(2-3): 391-6.
- Patick, A. K., S. L. Binford, et al. (1999). "In vitro antiviral activity of AG7088, a potent inhibitor of human rhinovirus 3C protease." Antimicrob Agents Chemother **43**(10): 2444-50.

- Perera, R., S. Daijogo, et al. (2007). "Cellular protein modification by poliovirus: the two faces of poly(rC)-binding protein." J Virol **81**(17): 8919-32.
- Petersen, J. F., M. M. Cherney, et al. (1999). "The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: a proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis." EMBO J **18**(20): 5463-75.
- Pevear, D. C., F. G. Hayden, et al. (2005). "Relationship of pleconaril susceptibility and clinical outcomes in treatment of common colds caused by rhinoviruses." Antimicrob Agents Chemother **49**(11): 4492-9.
- Pevear, D. C., T. M. Tull, et al. (1999). "Activity of pleconaril against enteroviruses." Antimicrob Agents Chemother **43**(9): 2109-15.
- Pfister, T., L. Pasamontes, et al. (1992). "Immunocytochemical localization of capsid-related particles in subcellular fractions of poliovirus-infected cells." Virology **188**(2): 676-84.
- Phillpotts, R. J., R. W. Jones, et al. (1981). "The activity of enviroxime against rhinovirus infection in man." Lancet **1**(8234): 1342-4.
- Phillpotts, R. J., J. Wallace, et al. (1983). "Therapeutic activity of enviroxime against rhinovirus infection in volunteers." Antimicrob Agents Chemother **23**(5): 671-5.
- Phipps, K. M., A. Martinez, et al. (2004). "Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism." Antiviral Res **61**(1): 49-55.
- Pilipenko, E. V., K. V. Poperechny, et al. (1996). "Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions." EMBO J **15**(19): 5428-36.
- Pitkaranta, A., E. Arruda, et al. (1997). "Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR." J Clin Microbiol **35**(7): 1791-3.
- Pitkaranta, A. and F. G. Hayden (1998). "Rhinoviruses: important respiratory pathogens." Ann Med **30**(6): 529-37.
- Pitkaranta, A., J. Jero, et al. (1998). "Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion." J Pediatr **133**(3): 390-4.

- Predy, G. N., V. Goel, et al. (2005). "Efficacy of an extract of North American ginseng containing poly-furanosyl-pyranosyl-saccharides for preventing upper respiratory tract infections: a randomized controlled trial." Cmaj **173**(9): 1043-8.
- Prego, C., M. Garcia, et al. (2005). "Transmucosal macromolecular drug delivery." J Control Release **101**(1-3): 151-62.
- Prevot, D., D. Decimo, et al. (2003). "Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning." Embo J **22**(8): 1909-21.
- Querol-Audi, J., T. Konecsni, et al. (2009). "Minor group human rhinovirus-receptor interactions: geometry of multimodular attachment and basis of recognition." FEBS Lett **583**(1): 235-40.
- racaniello (2007). Picornaviridae : the viruses and their replication. fields virology. 795-838. Philadelphia, Lippincott williams and wilkins.
- Ramtohul, Y. K., M. N. James, et al. (2002). "Synthesis and evaluation of keto-glutamine analogues as inhibitors of hepatitis A virus 3C proteinase." J Org Chem **67**(10): 3169-78.
- Ranjan, P., J. B. Bowzard, et al. (2009). "Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity." Trends Mol Med **15**(8): 359-68.
- Rathe, J. A., X. Liu, et al. (2010). "Full-genome sequence and analysis of a novel human rhinovirus strain within a divergent HRV-A clade." Arch Virol **155**(1): 83-7.
- Reed L.J., H. M. (1938). "a simple method of estimating 50 per cent end-points." Am J Hyg **27**: 493-497.
- Roebuck, K. A. and A. Finnegan (1999). "Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression." J Leukoc Biol **66**(6): 876-88.
- Rollinger, J. M. and M. Schmidtke (2009). "The human rhinovirus: human-pathological impact, mechanisms of antirhinoviral agents, and strategies for their discovery." Med Res Rev.
- Rossmann, M. G. (1989). "The structure of antiviral agents that inhibit uncoating when complexed with viral capsids." Antiviral Res **11**(1): 3-13.
- Rossmann, M. G., E. Arnold, et al. (1985). "Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses." Nature **317**(6033): 145-53.

- Rossmann, M. G., N. H. Olson, et al. (1994). "Crystallographic and cryo EM analysis of virion-receptor interactions." Arch Virol Suppl **9**: 531-41.
- Rotbart, H. A. (2002). "Treatment of picornavirus infections." Antiviral Res **53**(2): 83-98.
- Samo, T. C., S. B. Greenberg, et al. (1983). "Efficacy and tolerance of intranasally applied recombinant leukocyte A interferon in normal volunteers." J Infect Dis **148**(3): 535-42.
- Savolainen, C., S. Blomqvist, et al. (2002). "Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70." J Gen Virol **83**(Pt 2): 333-40.
- Savolainen, C., P. Laine, et al. (2004). "Sequence analysis of human rhinoviruses in the RNA-dependent RNA polymerase coding region reveals large within-species variation." J Gen Virol **85**(Pt 8): 2271-7.
- Savolainen, C., M. N. Mulders, et al. (2002). "Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons." Virus Res **85**(1): 41-6.
- Schechter, I. and A. Berger (1968). "On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain." Biochem Biophys Res Commun **32**(5): 898-902.
- Schiff, G. M. and J. R. Sherwood (2000). "Clinical activity of pleconaril in an experimentally induced coxsackievirus A21 respiratory infection." J Infect Dis **181**(1): 20-6.
- Schmidtke, M., E. Hammerschmidt, et al. (2005). "Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment." J Antimicrob Chemother **56**(4): 648-56.
- Schoop, R., P. Klein, et al. (2006). "Echinacea in the prevention of induced rhinovirus colds: a meta-analysis." Clin Ther **28**(2): 174-83.
- Schubert, S., J. P. Furste, et al. (2004). "Gaining target access for deoxyribozymes." J Mol Biol **339**(2): 355-63.
- Science, M., J. Johnstone, et al. "Zinc for the treatment of the common cold: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." Cmaj **184**(10): E551-61.

- Seipelt, J., A. Guarne, et al. (1999). "The structures of picornaviral proteinases." Virus Res **62**(2): 159-68.
- Seipelt, J., H. D. Liebig, et al. (2000). "2A proteinase of human rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells." J Biol Chem **275**(26): 20084-9.
- Shah, S. A., S. Sander, et al. (2007). "Evaluation of echinacea for the prevention and treatment of the common cold: a meta-analysis." Lancet Infect Dis **7**(7): 473-80.
- Sharma, R., S. Raychaudhuri, et al. (2004). "Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off." Virology **320**(2): 195-205.
- Sherry, B., A. G. Mosser, et al. (1986). "Use of monoclonal antibodies to identify four neutralization immunogens on a common cold picornavirus, human rhinovirus 14." J Virol **57**(1): 246-57.
- Shih, S. R., S. J. Chen, et al. (2004). "Selective human enterovirus and rhinovirus inhibitors: An overview of capsid-binding and protease-inhibiting molecules." Med Res Rev **24**(4): 449-74.
- Simmons, D., M. W. Makgoba, et al. (1988). "ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM." Nature **331**(6157): 624-7.
- Singh, M. and R. R. Das "Zinc for the common cold." Cochrane Database Syst Rev(2): CD001364.
- Skern, T., W. Sommergruber, et al. (1991). "Substrate requirements of a human rhinoviral 2A proteinase." Virology **181**(1): 46-54.
- Sommergruber, W., H. Ahorn, et al. (1992). "Cleavage specificity on synthetic peptide substrates of human rhinovirus 2 proteinase 2A." J Biol Chem **267**(31): 22639-44.
- Sommergruber, W., G. Casari, et al. (1994). "The 2A proteinase of human rhinovirus is a zinc containing enzyme." Virology **204**(2): 815-8.
- Sommergruber, W., J. Seipelt, et al. (1997). "Mutational analyses support a model for the HRV2 2A proteinase." Virology **234**(2): 203-14.
- Soto Rifo, R., E. P. Ricci, et al. (2007). "Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation." Nucleic Acids Res **35**(18): e121.

- Sousa, C., E. M. Schmid, et al. (2006). "Defining residues involved in human rhinovirus 2A proteinase substrate recognition." FEBS Lett **580**(24): 5713-7.
- Sperber, S. J. and F. G. Hayden (1988). "Chemotherapy of rhinovirus colds." Antimicrob Agents Chemother **32**(4): 409-19.
- Sperber, S. J., P. A. Levine, et al. (1989). "Ineffectiveness of recombinant interferon-beta serine nasal drops for prophylaxis of natural colds." J Infect Dis **160**(4): 700-5.
- Staunton, D. E., S. D. Marlin, et al. (1988). "Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families." Cell **52**(6): 925-33.
- Stone, J. K., R. Rijnbrand, et al. (2008). "A morpholino oligomer targeting highly conserved internal ribosome entry site sequence is able to inhibit multiple species of picornavirus." Antimicrob Agents Chemother **52**(6): 1970-81.
- Stott, E. J. and G. F. Heath (1970). "Factors affecting the growth of Rhinovirus 2 in suspension cultures of L132 cells." J Gen Virol **6**(1): 15-24.
- Sutherland, L. C., N. D. Rintala-Maki, et al. (2005). "RNA binding motif (RBM) proteins: a novel family of apoptosis modulators?" J Cell Biochem **94**(1): 5-24.
- Svitkin, Y. V., A. Gradi, et al. (1999). "Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection." J Virol **73**(4): 3467-72.
- Taimen, P., H. Berghall, et al. (2004). "NuMA and nuclear lamins are cleaved during viral infection--inhibition of caspase activity prevents cleavage and rescues HeLa cells from measles virus-induced but not from rhinovirus 1B-induced cell death." Virology **320**(1): 85-98.
- Tapparel, C., T. Junier, et al. (2007). "New complete genome sequences of human rhinoviruses shed light on their phylogeny and genomic features." BMC Genomics **8**: 224.
- Tapparel, C., T. Junier, et al. (2009). "New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses." Emerg Infect Dis **15**(5): 719-26.
- Teterina, N. L., E. A. Levenson, et al. (2010). "Viable polioviruses that encode 2A proteins with fluorescent protein tags." J Virol **84**(3): 1477-88.

- Thibaut, H. J., P. Leyssen, et al. "Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections." Antiviral Res **90**(3): 213-7.
- Thompson, S. R. and P. Sarnow (2003). "Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved." Virology **315**(1): 259-66.
- Tian, W., Z. Cui, et al. "Poliovirus 2A(pro) induces the nucleic translocation of poliovirus 3CD and 3C' proteins." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **43**(1): 38-44.
- Todd, S., J. H. Nguyen, et al. (1995). "RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA." J Virol **69**(6): 3605-14.
- Todd, S., J. S. Towner, et al. (1997). "Translation and replication properties of the human rhinovirus genome in vivo and in vitro." Virology **229**(1): 90-7.
- Tomassini, J. E., D. Graham, et al. (1989). "cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 4907-11.
- Toyoda, H., M. J. Nicklin, et al. (1986). "A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein." Cell **45**(5): 761-70.
- Turner (2007). Rhinoviruses. Fields Virology
- Turner, R. B., F. J. Dutko, et al. (1993). "Efficacy of oral WIN 54954 for prophylaxis of experimental rhinovirus infection." Antimicrob Agents Chemother **37**(2): 297-300.
- Turner, R. B., D. K. Riker, et al. (2000). "Ineffectiveness of echinacea for prevention of experimental rhinovirus colds." Antimicrob Agents Chemother **44**(6): 1708-9.
- Turner, R. B., M. T. Wecker, et al. (1999). "Efficacy of tremacamra, a soluble intercellular adhesion molecule 1, for experimental rhinovirus infection: a randomized clinical trial." JAMA **281**(19): 1797-804.
- Turner, R. B., K. W. Weingand, et al. (1998). "Association between interleukin-8 concentration in nasal secretions and severity of symptoms of experimental rhinovirus colds." Clin Infect Dis **26**(4): 840-6.

- Turner, R. B., B. Winther, et al. (1984). "Sites of virus recovery and antigen detection in epithelial cells during experimental rhinovirus infection." Acta Otolaryngol Suppl **413**: 9-14.
- van de Stolpe, A. and P. T. van der Saag (1996). "Intercellular adhesion molecule-1." J Mol Med (Berl) **74**(1): 13-33.
- Van Hoof, L., D. A. Vanden Berghe, et al. (1984). "Plant antiviral agents; V. 3-Methoxyflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis." Planta Med **50**(6): 513-7.
- Ventoso, I., A. Barco, et al. (1999). "Genetic selection of poliovirus 2Apro-binding peptides." J Virol **73**(1): 814-8.
- Verdaguer, N., I. Fita, et al. (2004). "X-ray structure of a minor group human rhinovirus bound to a fragment of its cellular receptor protein." Nat Struct Mol Biol **11**(5): 429-34.
- Verheyden, B., K. Andries, et al. (2004). "Mode of action of 2-furylmercury chloride, an anti-rhinovirus compound." Antiviral Res **61**(3): 189-94.
- Victor, F., T. J. Brown, et al. (1997). "Synthesis, antiviral activity, and biological properties of vinylacetylene analogs of enviroxime." J Med Chem **40**(10): 1511-8.
- Victor, F., R. Loncharich, et al. (1997). "Synthesis and antiviral activity of C2 analogs of enviroxime: an exploration of the role of critical functionality." J Med Chem **40**(21): 3478-83.
- Vlasak, M., S. Blomqvist, et al. (2003). "Sequence and structure of human rhinoviruses reveal the basis of receptor discrimination." J Virol **77**(12): 6923-30.
- Vojtek, A. B. and S. M. Hollenberg (1995). "Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis." Methods Enzymol **255**: 331-42.
- Voss, T., R. Meyer, et al. (1995). "Spectroscopic characterization of rhinoviral protease 2A: Zn is essential for the structural integrity." Protein Sci **4**(12): 2526-31.
- Waggoner, S. and P. Sarnow (1998). "Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells." J Virol **72**(8): 6699-709.
- Wald, T. G., P. Shult, et al. (1995). "A rhinovirus outbreak among residents of a long-term care facility." Ann Intern Med **123**(8): 588-93.

- Wang, J. H., H. J. Kwon, et al. (2009). "Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously." Laryngoscope **119**(7): 1406-11.
- Wang, Q., D. R. Nagarkar, et al. (2009). "Role of double-stranded RNA pattern recognition receptors in rhinovirus-induced airway epithelial cell responses." J Immunol **183**(11): 6989-97.
- Wang, Q. M., R. B. Johnson, et al. (1998). "Enzymatic characterization of refolded human rhinovirus type 14 2A protease expressed in Escherichia coli." J Virol **72**(2): 1683-7.
- Wang, Q. M., R. B. Johnson, et al. (1998). "Dual inhibition of human rhinovirus 2A and 3C proteases by homophthalimides." Antimicrob Agents Chemother **42**(4): 916-20.
- Wang, Q. M., R. B. Johnson, et al. (1998). "Development of in vitro peptide substrates for human rhinovirus-14 2A protease." Arch Biochem Biophys **356**(1): 12-8.
- Wang, Q. M., W. Sommergruber, et al. (1997). "Cleavage specificity of human rhinovirus-2 2A protease for peptide substrates." Biochem Biophys Res Commun **235**(3): 562-6.
- Wark, P. A., S. L. Johnston, et al. (2005). "Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus." J Exp Med **201**(6): 937-47.
- Watters, K. and A. C. Palmenberg "Differential processing of nuclear pore complex proteins by rhinovirus 2A proteases from different species and serotypes." J Virol **85**(20): 10874-83.
- Webber, S. E., K. Okano, et al. (1998). "Tripeptide aldehyde inhibitors of human rhinovirus 3C protease: design, synthesis, biological evaluation, and cocrystal structure solution of P1 glutamine isosteric replacements." J Med Chem **41**(15): 2786-805.
- Weber, N. D., D. O. Andersen, et al. (1992). "In vitro virucidal effects of Allium sativum (garlic) extract and compounds." Planta Med **58**(5): 417-23.
- Wells, S. E., P. E. Hillner, et al. (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." Mol Cell **2**(1): 135-40.

- Werle, M. and A. Bernkop-Schnurch (2006). "Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs." Amino Acids **30**(4): 351-67.
- White (1994). Medical Virology.
- Winther, B., K. McCue, et al. (2007). "Environmental contamination with rhinovirus and transfer to fingers of healthy individuals by daily life activity." J Med Virol **79**(10): 1606-10.
- Woelkart, K., K. Linde, et al. (2008). "Echinacea for preventing and treating the common cold." Planta Med **74**(6): 633-7.
- Wojcik, J., I. G. Boneca, et al. (2002). "Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria." J Mol Biol **323**(4): 763-70.
- Wyde, P. R., H. R. Six, et al. (1988). "Activity against rhinoviruses, toxicity, and delivery in aerosol of enviroxime in liposomes." Antimicrob Agents Chemother **32**(6): 890-5.
- Xian, M., Q. M. Wang, et al. (2000). "S-nitrosothiols as novel, reversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease." Bioorg Med Chem Lett **10**(18): 2097-100.
- Xiao, C., T. J. Tuthill, et al. (2004). "Discrimination among rhinovirus serotypes for a variant ICAM-1 receptor molecule." J Virol **78**(18): 10034-44.
- Yin, F. H. and N. B. Lomax (1986). "Establishment of a mouse model for human rhinovirus infection." J Gen Virol **67 (Pt 11)**: 2335-40.
- Yu, S. F. and R. E. Lloyd (1991). "Identification of essential amino acid residues in the functional activity of poliovirus 2A protease." Virology **182**(2): 615-25.
- Zhang, K. E., B. Hee, et al. (2001). "Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-NMR characterization of in vitro metabolites of a potent and irreversible peptidomimetic inhibitor of rhinovirus 3C protease." Drug Metab Dispos **29**(5): 729-34.
- Zhao, R., D. C. Pevear, et al. (1996). "Human rhinovirus 3 at 3.0 Å resolution." Structure **4**(10): 1205-20.
- Zoll, J., H. A. Heus, et al. (2009). "The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR." Virus Res **139**(2): 209-16.
- Zunszain, P. A., S. R. Knox, et al. (2010). "Insights into cleavage specificity from the crystal structure of foot-and-mouth disease virus 3C protease complexed with a peptide substrate." J Mol Biol **395**(2): 375-89.

Résumé :

Parce qu'ils sont la première cause virale d'infections des voies respiratoires supérieures et inférieures, les rhinovirus humains (RVH) constituent un problème majeur de santé publique. À ce jour, aucun vaccin ni antiviral n'est disponible pour lutter contre ces agents pathogènes. Un crible en double-hybride chez la levure nous a permis d'identifier un nouveau partenaire peptidique de la protéase virale à cystéine 2A (2A^{pro}), l'hexapeptide LVLQTM. Ce dernier agit comme un véritable pseudosubstrat de la 2A^{pro} et inhibe son activité. Ce peptide a été modifié chimiquement à son extrémité C-terminale avec un groupement réactif électrophile fluorométhylcétone pour former une liaison covalente avec le groupement thiol nucléophile du site actif de l'enzyme virale. Des expériences réalisées *ex vivo* et *in vivo* ont montré que le peptide LVLQTM modifié était un puissant inhibiteur de la réplication du RVH dans les cellules A549 et chez la souris. La structure 3D déjà connue de la 2A^{pro} du RVH-2 a ensuite permis de modéliser la fixation de LVLQTM dans la poche de liaison du substrat de la protéase et la comparaison des séquences des 2A^{pro} des espèces RVH-A, -B et -C a révélé que les résidus impliqués dans l'interaction avec le peptide LVLQTM sont relativement bien conservés.

Si le peptide inhibiteur semblait donc agir contre tous les sérotypes de RVH, son utilisation à des fins thérapeutiques pouvait être étendue à d'autres entérovirus puisqu'il inhibait également la 2A^{pro} de l'entérovirus 71 (EV-71) et par conséquent la réplication virale. De plus, la comparaison de la séquence des protéases 2A de l'EV-71 avec celle du RVH-A2 n'a révélé aucune différence majeure. Par conséquent, cette étude ouvre de nouvelles perspectives dans la mise au point d'un antiviral à large spectre d'action contre tous les entérovirus.

Mots clés : rhinovirus, antiviral, entérovirus, protéase 2A, peptide inhibiteur

Summary:

Human rhinoviruses (HRV) remain a significant public health problem as they are the major cause of both upper and lower respiratory tract infections. To date no vaccine or antiviral are available against these pathogens. Using a high-throughput yeast two-hybrid screening, we identified a six amino acid "hit" peptide, LVLQTM, which acted as a pseudo-substrate of the viral 2A cysteine protease (2A^{pro}) and inhibited its activity. This peptide was chemically modified at its C-terminus with a reactive electrophilic fluoromethylketone group to form a covalent linkage with the nucleophilic active site thiol of the enzyme. *Ex vivo* and *in vivo* experiments showed that thus converted, LVLQTM was a strong inhibitor of HRV replication in both A549 cells and mice. Based on HRV-2 2A^{pro} crystallographic data, a virtual docking model was then set up to predict the inhibitor binding mode into the ligand binding pocket of the enzyme. Sequence comparison between different 2A^{pro} from HRV-A, -B and -C species revealed that the aminoacid residues involved in the interaction with the inhibitor are relatively well conserved.

If our peptide inhibitor seemed to be of general use against all HRV serotypes, its use for therapeutic purposes could be extended to other enterovirus-associated diseases since it was also active against Human Enterovirus 71 (EV-71) 2A proteases and EV-71 replication. Moreover, comparison of the sequence of these proteases with the one of HRV-A2 revealed only minor differences in the residues involved in the interaction with LVLQTM. Therefore, this study opens new doors in the development of an antiviral against a wide range of enteroviruses.

Keywords : rhinovirus, antiviral, enterovirus, 2A protease, inhibitory peptide